

**EVALUIERUNG DES  
HISTON-LYSIN-DEMETHYLASEN-ISOENZYM-  
EXPRESSIONSMUSTERS IN KINDLICHER  
AKUTER LYMPHOBLASTISCHER LEUKÄMIE**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Elisabeth Walter  
geboren am 06. November 1990 in Eisenach**

## **Gutachter**

- 1. Prof. Dr. James F. Beck, Jena**
- 2. Prof. Dr. Meinolf Suttorp, Dresden**
- 3. Prof. Dr. Holger Lode, Greifswald**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.09.2018**

## **Inhaltsverzeichnis**

1	Zusammenfassung .....	1
2	Einleitung .....	3
2.1	Akute Lymphoblastische Leukämie .....	3
2.1.1	Epidemiologie .....	3
2.1.2	Ätiologie und Formen .....	3
2.1.3	Symptome und Diagnostik .....	4
2.1.4	Prognose und Risikostratifizierung .....	5
2.1.5	Therapie .....	6
2.1.5.1	Therapiekonzept .....	6
2.1.5.2	Chemotherapeutika – Dexamethason und Vincristin .....	7
2.2	Epigenetische Grundlagen .....	9
2.3	Bedeutung der Histon-Lysin-Demethylasen .....	10
2.3.1	LSD-Familie .....	12
2.3.2	Jumonji C-Familie .....	14
2.4	Inhibitoren der Histon-Lysin-Demethylasen .....	20
3	Ziele der Arbeit .....	22
4	Material & Methodik .....	23
4.1	Material .....	23
4.1.1	Geräte und Arbeitsmittel .....	23
4.1.2	Reagenzien und Kits .....	24
4.1.3	Software .....	25
4.1.4	Proben und Zelllinien .....	26
4.1.4.1	Patienten- und Knochenmarkspenderproben .....	26
4.1.4.2	Zelllinien und Medium .....	26
4.2	Methodik .....	26
4.2.1	Zellkultivierung und -passage .....	26
4.2.2	Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Real-Time-PCR .....	28

4.2.2.1	RNA-Isolation und Reverse Transkription der Zelllinien ....	28
4.2.2.2	TaqMan®-Real-Time-PCR .....	30
4.2.3	Wirkstoffbehandlung der Zellen .....	33
4.2.4	Durchflusszytometrie.....	33
4.2.4.1	Grundlagen .....	33
4.2.4.2	Vorbereitung und Durchführung der FACS-Analyse .....	35
4.2.5	Statistische Analyse der Daten .....	36
5	Ergebnisse.....	37
5.1	KDM-Expression in ALL-Patientenproben .....	37
5.1.1	Patientenproben.....	37
5.1.2	Quantitative KDM-Expressionsanalyse bei ALL-Patienten und gesunden Knochenmarkspendern .....	38
5.1.3	Korrelation der KDM-Expressionshöhen mit den korrespondierenden klinisch-pathologischen Parametern .....	39
5.2	KDM-Expressionsanalyse an ausgewählten Zelllinien.....	40
5.3	Experimente an CCRF-CEM-Zellen.....	41
5.3.1	Kombinationsbehandlung: GSK-J4 mit Dexamethason .....	41
5.3.2	Kombinationsbehandlung: GSK-J4 mit Vincristin .....	43
5.4	Experimente an Jurkat-Zellen.....	44
5.4.1	Kombinationsbehandlung: GSK-J4 mit Dexamethason .....	45
5.4.2	Kombinationsbehandlung: GSK-J4 mit Vincristin.....	46
5.5	z-VAD-fmk-Experimente .....	48
6	Diskussion .....	49
6.1	Expressionsanalyse der KDMs & Korrelation mit klinischen Prognoseparametern.....	49
6.2	Kombinationsbehandlungen: GSK-J4 mit Standardtherapeutika ...	55
6.2.1	Dexamethason-Sensibilisierung durch GSK-J4 .....	55
6.2.2	Antagonismus zwischen GSK-J4 und Vincristin.....	59

6.3	Induktion des apoptotischen Signalwegs durch GSK-J4 .....	60
7	Schlussfolgerungen .....	62
8	Anhang .....	64
8.1	Tabelle 6: KDM-Expression in Korrelation mit ausgewählten klinisch-pathologischen Parametern.....	64
8.2	Abbildungsverzeichnis .....	65
8.3	Tabellenverzeichnis .....	67
8.4	Literaturverzeichnis.....	68
8.5	Danksagung .....	80
8.6	Ehrenwörtliche Erklärung.....	81

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
$\beta_2$ M	$\beta_2$ -Mikroglobulin
bzw.	beziehungsweise
CA	Karzinom
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Unterscheidungsgruppen)
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CI	<i>combination index</i> (Kombinationsindex)
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CoREST	Corepressor von REST
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT	<i>Cycle Threshold</i> (Schwellenwert)
$\Delta\psi_m$	Mitochondriales Membranpotential
DiOC <sub>6</sub> (3)	3'3-Dihexyloxacarbocyaniniodid
DLBCL	<i>diffuse large B-cell lymphoma</i> (Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dsDNA	<i>double-stranded deoxyribonuclein acid</i> (Dopplestrang-DNA)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i> (Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer)
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Fe <sup>2+</sup>	Zweiwertiges Eisen
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
h	<i>hour</i> (Stunde)
H	Histon
HDAC	Histon-Deacetylase
HDACi	Histon-Deacetylaseinhibitor

K	Lysin
KDM	Lysin-Demethylase
KMT	Lysin-Methyltransferase
LSD1	<i>lysine specific demethylase 1</i> (Lysin-Demethylase 1A)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
MAO	Monoaminoxidase
mg	Milligramm
min	Minute
miRNA	<i>micro ribonucleic acid</i> (Mikro-Ribonukleinsäure)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MRD	<i>minimal residual disease</i> (Minimale Resterkrankung)
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
NCI	<i>National Cancer Institute</i> (Amerikanisches Krebsforschungsinstitut)
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
p21	Protein 21
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PI	Propidiumiodid
REST	<i>repressor element-1 silencing transcription factor</i>
RPMI-1640	Zellkulturmedium, formuliert am Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)
s.	siehe
SCC	<i>sideward scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
sec	<i>second</i> (Sekunde)
SWIRM	Proteindomäne, erstmals entdeckt in den Proteinen Swi3p, Rsc8p und Moira

TNF	Tumornekrosefaktor
U	Umdrehung
u. a.	unter anderem
z. B.	zum Beispiel
z-VAD-fmk	<i>Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketone</i>



## 1 Zusammenfassung

Die Histon-Lysin-Demethylasen (KDMs) sind eine erst kürzlich identifizierte Gruppe, von 32 Proteinen. Zwanzig dieser 32 KDMs können sowohl Histone als auch Nicht-Histon-Proteine demethylieren. Eine ganze Reihe von Befunden deuten darauf hin, dass viele KDMs eine entscheidende Rolle in der Kanzerogenese spielen. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der KDMs in der häufigsten kindlichen Tumorerkrankung, der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL), zu evaluieren. Dazu wurden die Expressionsmuster von zehn ausgewählten KDMs in Proben von 88 pädiatrischen ALL-Patienten und acht gesunden Knochenmarkspendern mittels Real-Time-RT-PCR bestimmt. Die vergleichende Analyse zeigte, dass die KDMs in den ALL-Proben größtenteils höher exprimiert waren als in den Knochenmarkspenderproben. KDM6B war die einzige Demethylase, die davon abwich und eine niedrigere Expression in den ALL-Proben aufwies. Im Weiteren wurden die Ergebnisse der Expressionsbestimmungen mit klinisch-pathologischen Parametern der Patienten korreliert. Diese Analyse zeigte insbesondere, dass eine erhöhte KDM6B-Expression bei Kranken mit ungünstigen Prognoseparametern assoziiert war. Dazu zählten das Erkrankungsalter unter einem bzw. über neun Jahren, das initial schlechte Ansprechen auf Prednison, sowie der immunologische T-Zell-Phänotyp. Dieses Ergebnis wies auf KDM6B als eine besonders interessante Kandidatin für weitergehende Untersuchungen.

Um die Eignung von KDM6B als einen neuen Therapieansatz zu prüfen, wurden in zwei ALL-Zelllinien, und zwar CCRF-CEM und Jurkat, Inhibitionsversuche mit dem KDM6-Inhibitor GSK-J4 angeschlossen. GSK-J4 zeigte sich als potenter Hemmstoff in beiden Zelllinien. Um einen möglichen Synergismus zwischen GSK-J4 und ALL-Standardtherapeutika zu überprüfen, folgten Kombinationsversuche. GSK-J4 wurde jeweils mit Dexamethason und Vincristin kombiniert, die einen festen Bestandteil der ALL-Therapieprotokolle darstellen. CCRF-CEM-Zellen offenbarten einen Synergismus zwischen GSK-J4 und Dexamethason. Die übrigen Kombinationsexperimente zeigten keine vorteilhafte Wirkung. Abschließend sollten Behandlungen mit dem Pan-Caspaseinhibitor z-VAD-fmk Hinweise auf den durch GSK-J4 ausgelösten Zelltodmechanismus geben. Hier konnte besonders in Jurkat-Zellen ein caspaseabhängiger Zelltod festgestellt werden.

Insgesamt konnte diese Arbeit neue Erkenntnisse zur Involvierung von KDMs in kindlicher ALL liefern. Vor allem deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass KDM6B eine besondere Rolle bei kindlicher ALL spielt und dass sich mit dem KDM6-Inhibitor GSK-J4 eine Glukokortikoid-Resistenz überwinden lässt. Diese Arbeit stellt also eine Grundlage dar, auf der die exakte Wirkungsweise von GSK-J4 und dessen Wechselwirkungen mit anderen Wirkstoffen tiefgehend evaluiert werden kann.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Akute Lymphoblastische Leukämie**

Die akute lymphoblastische, auch lymphatische, Leukämie (ALL) ist eine maligne Systemerkrankung, bei der die Hämatopoese von Zellen der lymphatischen Reihe gestört ist. Analog unterscheidet man die maligne Hämatopoese von Zellen der myeloischen Reihe, welche in der akuten myeloischen Leukämie (AML) resultiert.

Bei der ALL kommt es durch verschiedene pathogenetische Vorgänge zu einer Überproduktion von unreifen Lymphozyten, den sogenannten Blasten. Diese klonale Blastenvermehrung führt zur Verdrängung der physiologischen Blutbildung und somit zu den häufigen Erstsymptomen Anämie, Blutungs- und Infektneigung. (Hunger und Mullighan 2015)

#### **2.1.1 Epidemiologie**

Die akuten Leukämien sind mit einem Anteil von ca. 1 % unter allen neoplastischen Erkrankungen relativ selten. Schlüsselt man die Neoplasien jedoch nach Altersklassen auf, so machen akute Leukämien ungefähr ein Drittel aller malignen Krankheiten im Kindesalter aus und sind somit die häufigsten Malignome in dieser Altersklasse. Mehr als 75 % dieser kindlichen Leukämien sind ALL, weitere 18 % AML. Dabei sind Jungen etwas häufiger betroffen als Mädchen. (Kaatsch 2010, Linet et al. 2016)

Neue Therapieansätze konnten das Überleben der ALL-Patienten stark verbessern. Die Fünfjahresüberlebensrate liegt derzeit bei circa 90 %. Diese positiven Werte gelten jedoch für die Industrienationen. In Entwicklungsländern ist das Überleben noch deutlich schlechter. (Ward et al. 2014)

#### **2.1.2 Ätiologie und Formen**

Die exakten Pathomechanismen der ALL sind derzeit noch nicht hinreichend geklärt. Allerdings wird vermutet, dass es durch primäre genetische Veränderungen, aber auch Umweltfaktoren, wie möglicherweise die Einwirkung bestimmter chemischer Substanzen, radioaktiver Strahlung, Zytostatika oder Viren, zur Überproduktion der unreifen Lymphozyten kommt. Einige seltene hereditäre Veränderungen, wie z. B. Down-Syndrom, Bloom-

Syndrom und Fanconi-Anämie, sind prädisponierend für ALL. Insgesamt lassen sich gegenwärtig in über 75 % der Fälle primär genetische Veränderungen bei Kindern mit ALL finden. Neben genetischen Veränderungen sind zusätzliche postnatale Ereignisse für eine vollständige phänotypische Leukämiemanifestation erforderlich. (Pui et al. 2008, Schuz und Erdmann 2016, Hunger und Mullighan 2015)

Je nach Entwicklungsstufen und genetischen Veränderungen lassen sich verschiedene Formen der ALL unterscheiden. Die malignen Blasten können sich aus allen Entwicklungsstufen der B- und T-Lymphozyten entwickeln. Dementsprechend unterscheidet man leukämische Veränderungen nach Immunophänotyp von B-Lymphozyten in Pro-, Common-, Prä- und reife B-ALL. Vergleichbar werden die Formen der T-Lymphozyten kategorisiert in Pro-, Prä-, intermediäre und reife T-ALL. Da sich die ALL-Formen in Verlauf und Prognose unterscheiden, erfolgt je nach Art der Leukämie eine spezifische Therapiestratifizierung. (Cooper und Brown 2015)

### **2.1.3 Symptome und Diagnostik**

Durch Veränderung der Blutzusammensetzung können Symptome im gesamten Organismus auftreten und sind somit leider wenig spezifisch. Durch die Anämie treten häufig Müdigkeit, Blässe und ein allgemeines Krankheitsgefühl auf. Außerdem neigen die Kinder häufiger zu Infekten, präsentieren geschwollene Lymphknoten und zum Teil Fieber. Ferner kann es zu Hepatosplenomegalie, abdominalen Schmerzen und Inappetenz kommen. Aus der Verdrängung der Thrombozyten durch die Blasten resultiert eine gestörte Gerinnung, die sich in Epistaxis, gingivalen Blutungen oder Petechien äußern kann. Seltener sind dagegen Kopfschmerzen, Sehstörungen und Atemnot. (Hunger und Mullighan 2015)

Diagnostisch erfolgt zunächst eine Blutuntersuchung, danach wird der Leukämieverdacht mittels Knochenmarkpunktion gesichert. In diesen Untersuchungen erfolgt eine morphologische, immunologische und genetische Differenzierung der Blasten zur Evaluierung des Leukämietyps. Zur erweiterten Diagnostik gehören außerdem bildgebende Verfahren und die Liquordiagnostik. Die Ergebnisse dieser Verfahren erlauben Konsequenzen

für die weitere Vorgehensweise bezüglich der Therapie. (Hunger und Mullighan 2015, Smith et al. 1996)

### **2.1.4 Prognose und Risikostratifizierung**

Die Prognose ist von vielen verschiedenen Faktoren abhängig und muss individuell abgeschätzt werden. Ein starker Prognosefaktor ist das Alter zum Diagnosezeitpunkt. Kinder zwischen einem und neun Jahren haben demnach bessere Therapieergebnisse als Säuglinge und Kinder über neun Jahren. (Moricke et al. 2005, Smith et al. 1996) Dies äußert sich in der Fünfjahresüberlebensrate von 79 % bei den Ein- bis Neunjährigen, gegenüber 43 % bei Säuglingen und Neugeborenen bzw. 71 % bei Kindern über zehn Jahren. (Gaynon et al. 2010) Das Alter wird gemeinsam mit der ursprünglichen Leukozytenzahl zur Risikostratifizierung des amerikanischen Krebsforschungszentrums (engl. *National Cancer Institute*, NCI) verwendet. Je höher die initiale Leukozytenzahl, desto schlechter das Therapieergebnis. Dementsprechend werden Patienten nach Standardrisiko und hohem Risiko differenziert. Kinder die zwischen einem und zehn Jahren alt sind und eine Leukozytenzahl  $< 50.000/\mu\text{l}$  haben, sind Patienten mit Standardrisiko. Alle anderen, sowie Patienten mit zentralnervöser und testikulärer Beteiligung, zählen zur Hochrisikopopulation. (Moricke et al. 2005, Smith et al. 1996)

Einer der wichtigsten Vorhersagewerte für den Therapieverlauf ist die sogenannte Minimale Resterkrankung (engl. *minimal residual disease*, MRD) (Coustan-Smith et al. 2000). Dieser Parameter wird entweder im peripheren Blut am 8. Behandlungstag oder im Knochenmark am Ende der Induktionstherapie bestimmt. Wird in dieser Untersuchung ein Blast unter 100.000 Zellen gefunden, ist die MRD positiv und spricht für ein schlechtes Therapieansprechen und somit für eine ungünstige Prognose. Die Kombination aus MRD-Schwellenwert und den Kriterien des NCI wird zur Risikostratifizierung der in Deutschland verbreiteten Berlin-Frankfurt-Münster (BFM)-Studie verwendet. (Cooper und Brown 2015)

Neben dieser Risikostratifizierung wird auch das Ansprechen auf die Therapie, insbesondere auf die Prednisonbehandlung, prognostisch gewertet. In den Studien der BFM-Gruppe geht der primären Induktionstherapie eine Prophase voraus. Hier werden nach einer siebentägigen Prednisontherapie die Blasten

im peripheren Blut bestimmt. Dabei haben Patienten, deren leukämische Last sich unter Prednison auf weniger als  $10^9$  Blasten pro Liter verringert, ein geringeres Rezidivrisiko als Kinder, die schlecht oder gar nicht auf Prednison ansprechen (76 % Rezidivrisiko zu 43 %). (Riehm et al. 1987)

Auch die Immunophänotypen besitzen prognostische Relevanz. B-ALL-Formen sind mit einer Fünfjahresüberlebensrate von 76 %, prognostisch etwas günstiger als die T-ALL-Formen mit einer Fünfjahresüberlebensrate von 73 %. (Gaynon et al. 2010, Pui et al. 2009) Seltene Leukämieformen mit unklarem Immunophänotyp haben ebenfalls eine schlechte Prognose. (Cooper und Brown 2015)

Des Weiteren ist das Therapieergebnis von genotypischen Veränderungen abhängig. So zeigen Patienten mit einem hyperdiploiden Chromosomensatz ( $> 50$  Chromosomen), mit ETV6-RUNX1-Translokation (t(12; 21)) oder mit Trisomie 4, 10 und 17 bessere Ergebnisse als Kinder mit BCR-ABL1-Fusionsgen (t(9; 22), auch Philadelphia-Chromosom genannt), MLL-Translokation oder Hypodiploidie ( $< 44$  Chromosomen). (Moorman et al. 2007, Nachman et al. 2007, Arico et al. 2010)

### **2.1.5 Therapie**

#### **2.1.5.1 Therapiekonzept**

Die Therapie der kindlichen ALL beinhaltet typischerweise die folgenden vier Phasen: Induktion, Konsolidierung, Re-Induktion und Erhaltung. Je nach ALL-Form und Risikotyp gestaltet sich die Therapie intensiver, länger oder verwendet andere Medikamente.

Während der ersten Phase, der Remissionsinduktion, soll eine komplette Remission erreicht werden. Diese ist gekennzeichnet durch einen Rückgang der Blasten am Ende der Induktion auf weniger als 5 %. Diesen Zustand erreichen ca. 95 % der Kinder. Die Induktionstherapie ist eine intensive Chemotherapie über vier bis sechs Wochen und beinhaltet Vincristin, eins der Glukokortikoide Prednison oder Dexamethason, Asparaginase und eventuell noch eins der Anthrazykline Doxorubicin oder Daunorubicin. (Cooper und Brown 2015, Hunger und Mullighan 2015)

Nach dieser intensiven Remissionsinduktion folgt die Konsolidierungsphase, um die noch verbliebenen Blasten zu eliminieren. Diese dauert noch einmal

sechs bis neun Monate. Hier kommen vor allem Mercaptopurin, Thioguanin, Methotrexat, Cyclophosphamide, Etoposid und Cytarabin zum Einsatz. Am Ende der Konsolidierung schließt sich entweder eine Re-Induktion bei positiver MRD-Last oder eine Erhaltungstherapie an. Die Re-Induktion umfasst eine intensivierte Therapie mit ähnlichen Medikamenten wie bei der primären Induktionstherapie. Die Erhaltungstherapie wird für mindestens zwei Jahre angeschlossen, um das Rezidivrisiko zu minimieren. Diese erfolgt meist ambulant mit den weniger toxischen oralen Zytostatika Methotrexat und Mercaptopurin. (Hunger und Mullighan 2015, Cooper und Brown 2015)

Zusätzlich zu diesen Phasen kann je nach Risiko, Klinik und Prognose eine Behandlung des zentralen Nervensystems erfolgen. Gegenwärtig werden Medikamente dazu entweder direkt intrathekal appliziert oder es werden Medikamente verwendet, die systemisch verabreicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden können. (Cooper und Brown 2015) Eine weitere Möglichkeit ist die kraniale Bestrahlung, die jedoch nicht prophylaktisch durchgeführt werden sollte, sondern erst gezielt bei Rezidiven im zentralen Nervensystem. (Pui et al. 2009)

Für Hochrisikopatienten und Therapieversager kann außerdem eine allogene Stammzelltransplantation aus einer Blut- oder Knochenmarkspende durchgeführt werden. Vor allem Kinder über sechs Jahren mit erhöhtem Risiko und Kinder mit T-Zell-ALL profitieren von einer allogenen Stammzelltransplantation. (Hochberg et al. 2013, Hunger und Mullighan 2015)

### **2.1.5.2 Chemotherapeutika – Dexamethason und Vincristin**

Je nach Risikostratifizierung werden unterschiedliche Medikamente in der kindlichen ALL-Therapie eingesetzt. Glukokortikoide und Vincristin sind dabei allgegenwärtig und kamen auch in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz.

Dexamethason gehört zur Gruppe der Glukokortikoide und hat dementsprechend eine entzündungshemmende, immunsuppressive und antiallergische Wirkung. Es ist ein Derivat von Prednisolon, welches fluoriert und methyliert ist (9-Fluor-16 $\alpha$ -methylprednisolon). Es besitzt eine sechs- bis siebenfach höhere antiinflammatorische Wirkung als Prednison. Dies ist u. a. auf die längere Halbwertszeit von Dexamethason im Vergleich zu Prednison zurückzuführen. (Gaynon und Lustig 1995) Bei Raumtemperatur liegt

Dexamethason als wasserunlösliches, weißes Pulver vor. *Per os* appliziert, erreicht Dexamethason eine Bioverfügbarkeit von bis zu 90 %. (Liddle 1961) Im Blut liegt es vor allem in freier ungebundener Form vor und dringt, aufgrund seiner Lipophilität, ungehindert in Gewebe, Lymphblasten und das zentrale Nervensystem ein. Die Wirkung von Dexamethason wird durch Bindung am zytosolischen Glukokortikoidrezeptor vermittelt. Auf Zellebene kann es somit zum Zellzyklusarrest, modifizierter Onkogenexpression und anderen zytotoxischen Ereignissen kommen. Glukokortikoidrezeptoren kommen ubiquitär im Organismus vor, was die vielfältigen Nebenwirkungen, wie z. B. Osteoporose, psychische Störungen und Stoffwechselstörungen, der Dexamethasonbehandlung erklärt. Die Wirkung von Dexamethason ist von der Anzahl und Modifikation der Glukokortikoidrezeptoren abhängig. Beispielsweise haben Blasten der B-Zell-Leukämien eine höhere mediane Anzahl dieser Rezeptoren als Blasten der T-Zell-Leukämien. Unter diesen Voraussetzungen können Patienten mit T-Zell-ALL gar nicht im selben Maß von einer Glukokortikoidbehandlung profitieren wie Patienten mit B-Zell-ALL. (Gaynon und Lustig 1995) Dennoch gehört es auch im Falle der T-Zell-ALL zu den Standardtherapeutika der Leukämiebehandlung. (Cooper und Brown 2015)

Vincristin ist ein pflanzliches Alkaloid, das physiologisch in den Blättern von *Catharanthus roseus* vorkommt und zytotoxische Wirkung besitzt. Bereits in den 60er Jahren erkannte man eine myelosuppressive Wirkung des Pflanzenextrakts. Die Wirkung von Vincristin wird über Bindung an das Protein Tubulin vermittelt, welches dadurch nicht mehr zu Mikrotubuli polymerisiert werden kann. Dadurch können sich die Mikrotubuli des Mitosespindelapparats nicht adäquat ausbilden, es kommt zur Mitosehemmung und letztendlich zum Zelltod der neuen Zellen. Dieser Mechanismus ist maßgebend für die zytotoxische und onkolytische Wirkung von Vincristin. (Gidding et al. 1999) Andererseits werden Transport- und Sekretionswege gestört, ebenso wie die Stabilität des Zellskeletts. Durch die Beteiligung von Mikrotubuli an der axonalen Signalübertragung kommt es zur Unterbrechung neuronaler Signale und somit letztendlich zur Demyelinisierung und Denervierung. Dies erklärt neurotoxische Nebenwirkungen von Vincristin, wie z. B. Parästhesie und Polyneuropathie. (Moore und Pinkerton 2009) Vincristin wird über das



Cytochrom P450 3A4 metabolisiert. In der Polychemotherapie kann es hier zu Interaktionen kommen. Kortikosteroide können dieses Enzym induzieren und zu einer schnelleren *Clearance* von Vincristin führen. (van Schaik 2008)

## 2.2 Epigenetische Grundlagen

Die biologischen Funktionen einer Zelle, die Integration von Umgebungsreizen auf Zellebene und weitere Zellcharakteristika werden nicht nur durch die DNA-Sequenz, sondern auch durch posttranslationale Modifikationen, sogenannte epigenetische Muster, bestimmt. Diese können wie die DNA-Sequenz dazu beitragen, dass verschiedene Gene aktiviert oder reprimiert werden. Zu diesen epigenetischen Modifikationen gehören u. a. DNA-Methylierung, kovalente Histonmodifikationen und -austausch, welche die Chromatinstruktur verändern, und nicht-kodierende miRNAs. Die DNA-Methylierung ist von diesen unterschiedlichen Prozessen am besten untersucht. Diese Prozesse laufen physiologisch enzymgesteuert nach der Translation der Erbinformation ab und sind reversibel. (Arrowsmith et al. 2012) Zu den Histonmodifikationen zählt man u. a. Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitylierung und Sumoylierung verschiedener Aminosäurereste. All diese Prozesse werden enzymatisch kontrolliert. Zu den Modulatoren der Histon-Methylierung gehören Histon-Lysin-Methyltransferasen (KMT) und -Demethylasen (KDM). (Florea et al. 2011)

Veränderungen in diesen epigenetischen Regulationsmechanismen können z. B. dazu führen, dass bestimmte Enzyme über- oder unterexprimiert werden (z. B. Histondeacetylasen). Daraus resultiert zunächst eine aberrante Modifikation der Histone, welche zur Aktivierung bestimmter Onkogene bzw. Unterdrückung einiger Tumorsuppressorgene führen kann. Dies kann in einigen Fällen zu einer Krankheitsentwicklung beitragen. (Sharma et al. 2010) Einige besondere epigenetische Modifikationen wurden bisher mit verschiedenen Krankheiten, wie z. B. Entzündungsreaktionen, Tumorerkrankungen, metabolischen und neuropsychologischen Erkrankungen, in Verbindung gebracht. Das beweist, dass nicht nur Mutationen auf Genomebene eine Rolle bei der Krankheitsentwicklung spielen, sondern auch epigenetische Veränderungen zunehmend an Bedeutung gewinnen.

Verglichen mit Mutationen sind epigenetische Variationen reversibel und können daher für viele Krankheiten therapeutisch relevant werden. (Arrowsmith et al. 2012) Bei einigen Leukämieformen konnten bereits vereinzelt veränderte Expressionsmuster dieser Histon-verändernden Enzyme festgestellt werden. (He et al. 2011) Des Weiteren sind beispielsweise Histon-Deacetylaseinhibitoren bereits im klinischen Einsatz zur Therapie von hämatologischen Krebserkrankungen, wie z. B. dem T-Zell-Lymphom. (Arrowsmith et al. 2012, Prince et al. 2009)

### **2.3 Bedeutung der Histon-Lysin-Demethylasen**

Während der letzten Jahre hat sich herauskristallisiert, dass Epigenetik wesentlich an der Entwicklung von humanen Tumorerkrankungen beteiligt ist. Häufig wurden Genmutationen gefunden, die epigenetische Regulatoren kodieren und so zu aberranten Histonmodifikationen und DNA-Methylierungen geführt haben. (Arrowsmith et al. 2012, Hojfeldt et al. 2013) Bisher lag das Hauptaugenmerk der Epigenetik-Forschung, neben der DNA-Methylierung, vor allem auf den regulierenden Enzymen der Histon-Deacetylierung: Den Histon-Deacetylasen (HDAC) und deren Inhibitoren (HDACi). (Gruhn et al. 2013)

Ähnliche epigenetische Modulatoren sind die Histon-Lysin-Methyltransferasen (KMT), welche Methylgruppen an Lysin- oder Argininreste anfügen, und -Demethylasen (KDM), die die Methylgruppen entfernen. (Tian et al. 2013) Die Wirkung dieser Histonveränderungen ist stark vom Aminosäurerest und dem Grad der Methylierung abhängig. Beispielsweise führt eine Trimethylierung (me<sub>3</sub>) an Lysin (K) 4 des Histons H3 (H3K4me<sub>3</sub>) zu einer Transkriptionsaktivierung, während eine Trimethylierung an Lysin 9 des Histons H3 (H3K9me<sub>3</sub>) zur Repression des Genpromoters führt. (Florea et al. 2011) Durch Methylierung der Aminosäurereste verändert sich nicht deren Ladung, sodass die Struktur des Chromatins erhalten bleibt und der Methylierungsstatus alleine nicht zu veränderter Transkription führt. (Hojfeldt et al. 2013) Die Methylgruppen dienen vielmehr als Bindungsstellen für Proteine, die ihrerseits das Nukleosom komprimieren oder zusätzliche Regulatorproteine rekrutieren. Daraufhin kann es zur veränderten

Transkription verschiedener Gene kommen, die zu Krankheiten und Karzinogenese führen. (Arrowsmith et al. 2012)

Obwohl die Forschung der KDMs noch in den Kinderschuhen steckt, konnten auch bei ihnen Mutationen, Translokationen, Über- und Unterexpressionen determiniert werden. (Arrowsmith et al. 2012, Hojfeldt et al. 2013, Kooistra und Helin 2012) Anders als bei den gut evaluierten HDACs ist bei den KDMs eine Expressionserhöhung nicht grundsätzlich mit einer schlechteren Prognose assoziiert. (Kooistra und Helin 2012, Wang et al. 2009c, Weichert 2009) Es ist also unerlässlich, die Veränderungen der KDM-Isoenzyme individuell für jeden Tumortyp zu analysieren.

Bezüglich leukämischer Transformation von hämatopoetischen Zellen sind KMTs deutlich intensiver untersucht als KDMs. (Florea et al. 2011) Durch die Entdeckung der ersten Lysin-Demethylase KDM1A (auch LSD1, engl. *lysine specific demethylase 1*) wurde die Hypothese widerlegt, Histon-Methylierung sei eine irreversible epigenetische Veränderung. (Wigle und Copeland 2013) Bei den KDMs kann man mittlerweile zwei große Familien unterscheiden, die neben Histonen auch andere Proteine demethylieren: Die Flavin-abhängige LSD-Familie und die  $\text{Fe}^{2+}$ - und  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängige Jumonji C-Familie. (Hojfeldt et al. 2013)

Da einige KDMs vermehrt mit Kanzerogenese assoziiert werden, wurden die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit auf ausgewählte KDMs beschränkt. Nach sorgfältiger Literaturrecherche wurden zehn KDMs ausgewählt, die sich als potentielle therapeutische Angriffspunkte für die kindliche ALL eignen könnten: KDM1A, KDM2B, KDM3B, KDM4A, KDM4B, KDM4C, KDM5A, KDM5B, KDM6A und KDM6B. (Hojfeldt et al. 2013, van Haaften et al. 2009, Cloos et al. 2006, Ehrbrecht et al. 2006, He et al. 2011, Hu et al. 2001, Ntziachristos et al. 2014, Shen et al. 2012, Wada et al. 2015, Yang et al. 2000) Im Folgenden werden diese zehn KDMs familienbezogen näher vorgestellt.

Momentan ist die Nomenklatur der KDMs noch sehr uneinheitlich, zum Teil haben die Enzyme bis zu fünf verschiedene Bezeichnungen. (Hojfeldt et al. 2013) Zum besseren Verständnis wird in der vorliegenden Arbeit durchgehend die Bezeichnung KDM verwendet. (s. Tabelle 1).

	Synonyme
<b>KDM1A</b>	LSD1, AOF2, BHC110, KIAA061
<b>KDM2B</b>	FBXL10, JHDM1B, Ndy1
<b>KDM3B</b>	
<b>KDM4A</b>	JMJD2A, JHDM3A
<b>KDM4B</b>	JMJD2B, JHDM3B
<b>KDM4C</b>	JMJD2C, JHDM3C, GASC1
<b>KDM5A</b>	JARID1A, RBP2, RBBP2
<b>KDM5B</b>	JARID1B, PLU-1
<b>KDM6A</b>	UTX
<b>KDM6B</b>	JMJD3

*Tabelle 1: Synonyme der zehn ausgewählten KDMs*

### 2.3.1 LSD-Familie

Die LSD-Familie wurde nach der ersten entdeckten Lysin-spezifischen Demethylase benannt und enthält die zwei Enzyme KDM1A und KDM1B. Beide demethylieren H3K4. KDM1A katalysiert zusätzlich die Demethylierung von H3K9. (Hojfeldt et al. 2013) Beide Enzyme besitzen eine Aminooxidase-ähnliche Domäne, die das katalytische Zentrum bildet. Die saure Oberfläche der Substratbindungstasche ermöglicht eine Bindung mit dem basischen N-Terminus des Histons. Für die Reaktion benötigen die LSD-Enzyme den Cofaktor Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) als Elektronenüberträger. Da hierbei jedoch nur ein Elektronenpaar verfügbar ist, können KDM1A und -1B nur mono- und dimethylierte Lysinreste demethylieren. (Chen et al. 2006)

#### **KDM1A**

KDM1A wurde 2004 als erste Histon-Demethylase entdeckt (Shi et al. 2004). Sie besteht aus drei Domänen: Einer N-terminalen SWIRM-Domäne (Swi3p/Rsc8p/Moira), einer C-terminalen Aminooxidase-Domäne und einer sogenannten Turmdomäne (engl. *tower domain*). Die Aminooxidase-Domäne besitzt eine Substratbindungsstelle sowie eine weitere Bindungsstelle für den Cofaktor FAD. (Chen et al. 2006) Die SWIRM-Domäne ermöglicht direkte

Protein-Protein-Interaktionen. Dadurch ist überhaupt erst eine Komplexbildung von KDM1A mit anderen Enzymen möglich. KDM1A agiert so als multifunktionelle Untereinheit in verschiedenen Komplexen, die Histone verändern können. (Rudolph et al. 2013) Je nach Bindungspartner in den verschiedenen Komplexen verändert sich neben der Funktion auch die Substratspezifität von KDM1A. Während KDM1A z. B. im Komplex mit dem Repressor CoREST die Transkription durch Demethylierung von H3K4 reprimiert, kommt es durch Interaktion mit dem Androgen- bzw. Östrogen-Rezeptor zu einer Transkriptionsaktivierung, indem H3K9 demethyliert wird. (Metzger et al. 2005, Shi et al. 2003)

Um Genaueres über die biologischen Funktionen der einzelnen KDMs zu erfahren, haben einige Arbeitsgruppen das Verhalten und die Entwicklung bei charakteristischen *Knockout*-Mäusen evaluiert. Dabei entdeckte man, dass KDM1A für die Gastrulation der Embryonalentwicklung verantwortlich ist. Folglich war die Depletion von *KDM1A* letal für die Embryonen. (Wang et al. 2009b) Die *KDM1B-Knockout*-Mäuse verhielten sich ähnlich. (Ciccone et al. 2009)

Von KDM1A existieren vier Isoformen, von denen zwei nur in hämatopoetischen Zellen vorkommen. Bisweilen existieren jedoch keine weiteren Informationen über deren biologische Funktion im Organismus. Wada et al. (2015) zeigten, dass die Überexpression der kürzesten Isoform zur leukämischen Transformation von hämatopoetischen Stammzellen prädisponiert. Diese Prädisposition wurde u. a. der Hochregulation der HoxA2-A10-Gene zugeschrieben, die eine wichtige Rolle bei der Stammzellintegrität und Leukämieentwicklung spielen. (Starkova et al. 2010) Weitere Analysen zeigten, dass KDM1A in normalen hämatopoetischen Stammzellen nur schwach ausgeprägt war, in den meisten Leukämiezelllinien dagegen stark exprimiert wurde. Diese Überexpression betraf v. a. Zelllinien mit Fusionsgenen wie BCR-ABL und lymphoblastischer T-Zell-Leukämie (z. B. Jurkat). (Wada et al. 2015) In murinen AML-Zellen entdeckte man hohe Expressionswerte von KDM1A. Dadurch konnten spezielle Tumorprogramme erhalten werden und somit der Differenzierung und Apoptose der leukämischen Stammzellen entgegengewirkt werden. Hier lässt sich für die AML eine neue Therapieoption erahnen. (Harris et al. 2012) Bezüglich ALL

liegen bisher nur wenige Ergebnisse vor. Hier entdeckte man eine doppelte Rolle von KDM1A bei T-ALL. Ein besonderes genomisches Kennzeichen der T-ALL kann eine aktivierende *NOTCH1*-Mutation sein, die onkogen wirkt. Je nach Substrat wirkt KDM1A entweder als Corepressor oder als Coaktivator. In Abwesenheit von NOTCH1 wird H3K4me2 durch Interaktion von KDM1A mit einem DNA-Bindungsfaktor demethyliert. Somit werden NOTCH1-Targets reprimiert und eine leukämische Transformation verhindert. Ist NOTCH1 dagegen präsent, katalysiert KDM1A die Demethylierung von H3K9me2 und wirkt dann als NOTCH1-Coaktivator. (Amente et al. 2013) Auch hier könnte eine KDM1A-Inhibition eine neue Therapieoption für T-ALL darstellen. Neben diesen Funktionen bei Leukämie ist KDM1A noch an vielen anderen Tumortypen beteiligt. Demnach ist KDM1A in vielen Karzinomen (CA), wie z. B. Prostata-CA, Lungen-CA, Leber-CA, Kolorektales CA, undifferenziertes Neuroblastom und Östrogen-Rezeptor-negatives Mamma-CA, überexprimiert. (Hayami et al. 2011, Kahl et al. 2006, Lim et al. 2010, Schulte et al. 2009, Zhao et al. 2013) Eine Metaanalyse bestätigte einen Zusammenhang zwischen der Überexpression von KDM1A und einem schlechten Überleben der Krebspatienten. (Wu et al. 2015)

### 2.3.2 Jumonji C-Familie

Die Jumonji C-Familie umfasst 30 Proteine, wobei bei bisher 18 eine demethylierende Aktivität bekannt ist. (Kooistra und Helin 2012) Alle Enzyme besitzen die katalytische Jumonji C-Domäne. Sie arbeiten  $\text{Fe}^{2+}$ -abhängig und benötigen  $\alpha$ -Ketoglutarat als Cofaktor. (Krishnan und Trievel 2013) Im Gegensatz zu den LSD-Enzymen können die Jumonji-Enzyme sowohl mono-, di- als auch trimethylierte Aminosäurereste demethylieren. (Whetstine et al. 2006) Bisher sind sieben Subfamilien bekannt, die Histone und andere Proteine an unterschiedlichen Lysinresten von verschiedenen Histonen demethylieren. (Hojfeldt et al. 2013) Einzelne Jumonji C-Enzyme demethylieren auch Argininreste von Histonen und anderen Proteinen. (Chang et al. 2007)

Studien belegen die Beteiligung der Jumonji C-Enzyme am Zellreifungsprozess. Die Jumonji C-Enzyme sind außerdem beteiligt an der Transkriptionsregulation, der Stilllegung von Genen, der Erhaltung des

Heterochromatinstatus, der X-chromosomalen Inaktivierung, der Zellentwicklung und dem Verlauf des Zellzyklus. (Cloos et al. 2008) Diese vielfältigen Mechanismen werden nicht durch alle KDMs ausgeführt. Somit ist es essentiell die genaue Funktion jeder einzelnen KDM zu evaluieren.

### ***KDM2B***

Zur Erforschung der genauen physiologischen Funktionen von KDM2B wurden auch hier Mäuse untersucht, bei denen *KDM2B* depletiert wurde. Diese Untersuchungen ergaben eine Beteiligung von KDM2B an der Entwicklung des Nervensystems. Mäuse ohne exprimierte KDM2B entwickelten Neuralrohrdefekte bis zur Exenzephalie und starben während oder kurz nach der Geburt. (Fukuda et al. 2011)

Des Weiteren ist KDM2B beim Blasen-CA, Pankreasgang-CA und verschiedenen Leukämien hochreguliert und als Onkogen der menschlichen Leukämie bekannt. (He et al. 2011, Kooistra und Helin 2012, Tzatsos et al. 2013) Das Enzym spielt eine wichtige Rolle bei der leukämischen Transformation von hämatopoetischen Vorläuferzellen, die letztendlich zur Entstehung der AML beiträgt. (Ueda et al. 2015) Der genaue Mechanismus ist jedoch noch unbekannt. Außerdem wird bei der Tumorgenese ein Wirkmechanismus von KDM2B vermutet, der über die Verbindung mit Transkriptionsrepressoren, sogenannten Polycomb-Gruppen, an Transkriptionsstartpunkten vermittelt wird. (He et al. 2011) Ein weiterer transkriptionsaktivierender Mechanismus scheint über die Komplexbildung mit MYC-Onkogenen und KDM5A zu laufen. (Tzatsos et al. 2013)

### ***KDM3B***

Aberrant hohe Expressionslevel von KDM3B konnten in hämatopoetischen Zellen nachgewiesen werden, einschließlich Zellen von AML-Zelllinien. Das Gen für KDM3B ist in einem Chromosomenabschnitt gelegen, der vor allem bei AML und myelodysplastischem Syndrom oft deletiert ist. (Yoshimi und Kurokawa 2011) Dies lässt vermuten, dass KDM3B bei diesen Erkrankungen eine Tumorsuppressorfunktion zukommt. (Hu et al. 2001)

Bei *KDM3B*-defizitären Mäusen zeigte sich eingeschränktes Wachstum postpartal sowie Infertilität bei den weiblichen Tieren. Somit scheint KDM3B

neben der somatischen auch die germinale Entwicklung zu beeinflussen. (Liu et al. 2015)

### ***KDM4A, -4B & -4C***

Bei Untersuchungen am Blasen-CA fand man eine niedrigere Expression von KDM4A in malignem Gewebe verglichen mit gesundem Urothel. Zusätzlich entdeckte man einen Zusammenhang zwischen Expressionslevel und Prognose beim Urothel-CA. Je niedriger die KDM4A-Expressionshöhe war, desto schlechter fiel die Prognose des Patienten aus. Diese Ergebnisse verhielten sich konträr zu Beobachtungen bei KDM1A, die überexprimiert beim Urothel-CA in Erscheinung trat. (Kauffman et al. 2011) Des Weiteren wurden hohe Expressionslevel von KDM4A beim Mamma-CA entdeckt. (Patani et al. 2011)

Forschungen am Prostata-CA ergaben bisher stets Verbindungen mit erhöhter KDM-Expression, so auch bei KDM4A, -4B und -4C. (Cloos et al. 2006) Weitere Zusammenhänge zwischen KDM4B und Tumorgenese sind bisher nur bei dem seltenen malignen peripheren Nervenscheidentumor bekannt. (Kooistra und Helin 2012)

KDM4C ist beim Ösophagusplattenepithel-CA überexprimiert und trägt zur Entwicklung und Progression dieses und anderer Tumoren bei. (Yang et al. 2000) Selbiges gilt für das Mamma-CA und Medulloblastom. (Ehrbrecht et al. 2006, Liu et al. 2009)

KDM4B und -4C scheinen eine Rolle für die Stammzellfunktion und -differenzierung zu spielen. (Das et al. 2014, Loh et al. 2007) Bezüglich Leukämie ist bekannt, dass KDM4A, -4B und -4C gemeinsam zur leukämischen Transformation von myeloischen Vorläuferzellen bei MLL-translozierter Leukämie beitragen. Durch *Knockout* von KDM4A, -4B und -4C kam es zu einem verminderten Wachstum der AML-Zellen im Mausmodell. (Agger et al. 2016)

Mäuse mit *KDM4A*-Depletion zeigten außerdem kardiale Anomalien, die sich durch eine abgeschwächte Hypertrophie als Reaktion auf kardialen Stress bemerkbar machte. Zusätzlich wurde eine Hochregulierung von KDM4A bei Mäusen mit hypertropher Kardiomyopathie gefunden. (Zhang et al. 2011)



### **KDM5A**

Forschungen bezüglich KDM5A zeigten viele verschiedene Ergebnisse. Neben einer Deletion bzw. Herunterregulierung des Enzyms bei Melanomen fanden sich Mutationen bei Ankylosierender Spondylitis. (Pointon et al. 2011, Vogt et al. 1999) Hinsichtlich Leukämien wurde ein Fusionsgen von *KDM5A* mit *NUP98* (engl. *nucleoporin*) entdeckt. (van Zutven et al. 2006) Fusionen mit *NUP98* sind typisch für Leukämien. Das Fusionsgen *NUP98-KDM5A* zeigte bei Kindern mit akuter megakaryoblastischer Leukämie, einer Verlaufsform der AML, jedoch keine Korrelation mit prognostisch ungünstigen Parametern. (de Rooij et al. 2013)

Der murine *Knockout* von *KDM5A* äußerte sich in aberrantem Apoptoseverhalten hämatopoetischer Stammzellen. (Klose et al. 2007) Bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) stimulierte KDM5A die Zelldifferenzierung und hemmte die Zellproliferation. Des Weiteren zeigte sich ein verändertes KDM5A-Expressionsmuster mit zunehmendem Krankheitsverlauf. In frühen CML-Stadien war KDM5A verhältnismäßig höher exprimiert als in späten Krankheitsstadien. (Zhou et al. 2015)

### **KDM5B**

Die Depletion von *KDM5B* im Mausmodell führte zur frühen embryonalen Letalität. Außerdem ist KDM5B an der physiologischen Entwicklung und Differenzierung der Brustdrüsen beteiligt. (Catchpole et al. 2011) Dementsprechend findet man beim Mamma-CA erhöhte KDM5B-Expressionswerte. (Barrett et al. 2002) Des Weiteren ergab sich auch beim Blasen-, Prostata-CA und Melanom eine Überexpression. (Hayami et al. 2010, Xiang et al. 2007b, Roesch et al. 2010) KDM5B war zudem bei dem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom (engl. *diffuse large B-cell lymphoma*, DLBCL) und einigen leukämischen Zelllinien stark ausgeprägt. (Liggins et al. 2010, Su et al. 2015)

### **KDM6A**

Auch KDM6A ist wie viele andere KDMs bei Patienten mit Mamma-CA überexprimiert. (Patani et al. 2011) Außerdem wurden Mutationen von KDM6A bei verschiedenen Krebstypen, wie Ösophagusplattenepithel-CA, Nierenzell-

CA sowie Leukämie, entdeckt. (Jankowska et al. 2011, van Haaften et al. 2009) Besonders interessant ist, dass die inaktivierenden leukämischen Mutationen, neben Patienten mit AML und CML, vor allem bei männlichen T-ALL-Patienten eruiert werden konnten. (Jankowska et al. 2011, Van der Meulen et al. 2015, Mullighan et al. 2007) Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass KDM6A als Tumorsuppressor bei den oben genannten Tumoren, Ösophagus-CA, Nierenzell-CA und T-ALL, agiert.

Des Weiteren ist KDM6A unabdingbar für die somatische Zellprogrammierung sowie Ekto- und Mesodermentwicklung. (Ntziachristos et al. 2014) So führte der Verlust von *KDM6A* bei Mäusen beispielsweise zu letalen Defekten in der Herzentwicklung. (Lee et al. 2012) Zusätzlich scheint KMD6A auch an der neuronalen Entwicklung beteiligt zu sein, da Neuralrohrdefekte ohne *KDM6A* auftraten. (Kooistra und Helin 2012)

### ***KDM6B***

KDM6B demethyliert H3K27. Ist H3K27 trimethyliert, führt dies über inaktive Genpromotoren zu einer Repression der Genexpression, wohingegen monomethyliertes H3K27 Promotorregionen aktiviert. KDM6B sorgt somit für eine Transkriptionsaktivierung. (Burchfield et al. 2015) KDM6B war die erste KDM, deren mutierte Form bei Krebs gefunden wurde. (van Haaften et al. 2009) KDM6B ist an der gesamten Entwicklung des Organismus beteiligt. Sowohl auf der kleinsten Ebene der Zelldifferenzierung, -proliferation und -alterung, als auch bei der Keimblatt- und Organentwicklung. Da KDM6B an allen drei Keimblattdifferenzierungen beteiligt ist, können entsprechend an fast allen Organen Defekte auftreten.

In der Neurogenese kontrolliert KDM6B beispielsweise die Expression anderer wichtiger Regulatorgene. (Burgold et al. 2008). So konnten Studien eine Beteiligung von KDM6B an neurologischen Erkrankungen wie Parkinson, wo KDM6B die Differenzierung dopaminerger Neurone vermittelt (He et al. 2015), und Alzheimer aufzeigen. (Fonseca et al. 2012) Eine Inaktivierung von KDM6B kann ferner auch zu Dysfunktionen von Nervenzellen, z. B. im Atemzentrum und der Retina beitragen. (Burchfield et al. 2015)

Durch einen *KDM6B-Knockout* konnte der Einfluss von KDM6B bei der Lungenentwicklung evaluiert werden. Dieser *Knockout* resultierte in einer

fehlerhaften Lungenentwicklung mit verdickten Alveolarmembranen. Die *KDM6B-Knockout*-Mäuse verstarben dabei perinatal durch respiratorisches Versagen. (Li et al. 2014) Des Weiteren könnte eine erhöhte KDM6B-Expression durch vermehrte Zellproliferation und verminderte p21-Expression zur Entwicklung vom Bronchial-CA beitragen. (Burchfield et al. 2015) Bezüglich der Differenzierung der Verdauungsdrüsen entdeckte man, dass die KDM6B-Expression bei präkanzerogenen Pankreasläsionen einerseits erhöht ist, jedoch der Verlust von *KDM6B* die Malignität eines ausgeprägten Pankreas-CAs verstärkt und mit zunehmender Lebermetastasierung einhergeht. (Yamamoto et al. 2014)

Eine Hochregulation von KDM6B, die u. a. durch vermehrte Expression realisiert wird, tritt z. B. vermehrt beim Prostata-CA und Pleuramesotheliom auf. (Cregan et al. 2017, Xiang et al. 2007a) Beim Prostata-CA steigt die Expression zusätzlich mit der Metastasierung. (Xiang et al. 2007a)

Ebenso wie vermehrte KDM6B-Ausprägung wurden aber auch Unterexpressionen beobachtet. Vor allem beim Nierenzell-, Lungen- und Leber-CA ist KDM6B niedrig ausgeprägt. (Hong et al. 2017, Agger et al. 2009) Bei *KDM6B*-defizitären murinen embryonalen Stammzellen entdeckte man eine gestörte Differenzierung endothelialer Zellen und Herzvorläuferzellen. (Ohtani et al. 2013)

In Hinsicht auf Leukämie finden sich sowohl verminderte als auch erhöhte Expressionslevel von KDM6B. Besonders bei T-ALL-Zellen ist KDM6B, im Vergleich zu anderen Leukämietypen und normalen T-Vorläuferzellen, am stärksten ausgeprägt. (Dik et al. 2005, Valk et al. 2004) Ebenso erhöhte KDM6B-Expressionslevel finden sich bei chronischer B-Zell-Leukämie. (Agger et al. 2009) Als Teil des NOTCH1-Transkriptionskomplexes scheint KDM6B eine Schlüsselrolle bei bestimmten onkogenetischen Programmen der T-ALL zu spielen. Durch *KDM6B*-Ablation in murinen T-Zellen konnte ein Rückgang der leukämischen Blasten im peripheren Blut sowie in Milz und Leber erreicht werden; gleichzeitig stiegen die Überlebensraten. (Ntziachristos et al. 2014) Besonders niedrige KDM6B-Ausprägungen konnten u. a. beim Burkitt-Lymphom, beim DLBCL und beim Multiplen Myelom festgestellt werden. (Agger et al. 2009) Für die beiden letztgenannten lymphatischen

Erkrankungen liegen jedoch auch andere Daten vor, die auf eine KDM6B-Überexpression hinweisen. (Mathur et al. 2017, Ohguchi et al. 2017)

Neben diesen vielen Rollen in der Zell- und Tumorentwicklung wird KDM6B auch durch virale und inflammatorische Stimuli induziert. (De Santa et al. 2007) Dabei kann KDM6B sowohl die pro- als auch antiinflammatorische Immunantwort verstärken. Verschiedene Studien ergründeten dabei eine Beteiligung von KDM6B an der Schaumzellentwicklung bei Arteriosklerose, der Interleukinausschüttung bei diabetischen Wunden und der Reaktivierung des Herpes-simplex-Virus 1 in Ganglien. (Gallagher et al. 2015, Messer et al. 2015, Yan et al. 2014)

Diese Ergebnisse zeigen, dass KDM6B ubiquitär vorkommt und somit an vielfältigen Zellmechanismen beteiligt ist.

## **2.4 Inhibitoren der Histon-Lysin-Demethylasen**

Da die erste KDM erst vor wenigen Jahren entdeckt wurde, liegen momentan noch wenige Daten bezüglich passender Inhibitoren vor. Allerdings besitzen die KDMs ein gut definiertes aktives Zentrum, welches als gutes Strukturmerkmal für selektive Inhibitoren dienen könnte. (Hojfeldt et al. 2013) Die meisten Informationen liegen bisweilen für die am besten untersuchte KDM1A vor. Das katalytische Zentrum von KDM1A besitzt einige Homologien mit den Monoaminoxidasen (MAO) MAO-A und MAO-B. Durch diese Ähnlichkeiten begann man Inhibitionsversuche zunächst mit den potenten irreversiblen MAO-Hemmern Tranylcypromin und Rasagilin, die schon erfolgreich zur Therapie von Depressionen und Parkinson angewendet wurden. (Maes et al. 2015) Tranylcypromin zeigte Wirkung gegen KDM1A, jedoch verhielt es sich wenig spezifisch und sehr toxisch. (Lee et al. 2006) Da sich im Mausmodell unter leukämisch wirksamen Tranylcypromin-Dosen schwere Nebenwirkungen, v. a. im zentralen Nervensystem und der Erythropoese, zeigten, wird bis heute an weiteren Substanzen gearbeitet. Daraufhin entwickelte man die Substanzen weiter, zu Tranylcypromin-Derivaten mit höherer Spezifität und Wirksamkeit. Das bisher vielversprechendste Derivat ist ORY-1001 und befindet sich seit Ende 2013 in

Klinischen Phase I-Studien zur AML-Behandlung. (Mould et al. 2015, Hojfeldt et al. 2013)

Ein anderer vielversprechender KDM-Inhibitor ist GSK-J4. Dies ist ein Prodrug von GSK-J1 und inhibiert selektiv die Enzyme der KDM6-Familie, dabei jedoch KDM6B stärker als KDM6A. Durch das Anfügen von zusätzlichen Ethylestern an das stark polare GSK-J1 entsteht das zellpermeable GSK-J4. Intrazellulär wird GSK-J4 wieder zu GSK-J1 hydrolysiert, sodass pharmakologisch relevante Konzentrationen von GSK-J1 intrazellulär vorliegen. Die in GSK-J1 enthaltene Propansäure hemmt kompetitiv KDM6B, indem es die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Bindung imitiert. Diese Inhibition führt zu verminderter TNF- $\alpha$ - und Zytokinexpression. (Kruidenier et al. 2012) Außerdem hemmt GSK-J4 die Zellproliferation bei T-ALL-Zelllinien. Indes bleiben myeloische Leukämiezellen und andere hämatopoetische Vorläuferzellen unbeeinflusst. (Ntziachristos et al. 2014) In einer anderen Studie fand man heraus, dass GSK-J4 sogar die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann. Kultivierte Zellen eines diffusen intrinsischen Ponsglioms zeigten unter GSK-J4 eine Abnahme der Zellviabilität. (Hashizume et al. 2014) Diese Eigenschaft könnte eventuell auch ALL-Patienten mit ZNS-Beteiligung zugutekommen.

### **3 Ziele der Arbeit**

Die KDMs sind eine erst kürzlich identifizierte Gruppe von 32 epigenetisch wirksamen Proteinen. Bei zwanzig dieser KDMs ist bisher bekannt, dass sie Histone wie auch Nicht-Histon-Proteine demethylieren können. (Hojfeldt et al. 2013, Tian et al. 2013)

Da epigenetische Enzyme in unterschiedlichem Ausmaß zu Krankheitsentwicklung und Tumorgenese beitragen können, sind nun auch die jüngst entdeckten KDMs in den Fokus der Forschung gerückt. Hinsichtlich Leukämie liegen bisher nur wenige Studien vor, in denen beispielsweise eine Überexpression der KDM1A, KDM2B, KDM5A und KDM6B gezeigt werden konnte. (He et al. 2011, van Zutven et al. 2006, Wada et al. 2015, Zhou et al. 2015, Valk et al. 2004) Allerdings gilt bei den KDMs nicht pauschal, dass eine Überexpression mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist, anders als bei den HDACs. (Weichert 2009)

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bedeutung der KDMs in kindlicher ALL zu ergründen. Dazu wurden die zehn bedeutsamen KDMs KDM1A, -2B, -3B, -4A, -4B, -4C, -5A, -5B, -6A und -6B für quantitative und funktionelle Untersuchungen ausgewählt. Durch Genexpressionsanalysen und Korrelation mit ausgewählten Prognoseparametern sowie Krankheitsverläufen sollte versucht werden, die Relevanz der einzelnen KDMs für kindliche ALL zu definieren. Hierbei wurden die zehn ausgewählten KDMs in 88 Patientenproben und acht Knochenmarkspenderproben analysiert.

Des Weiteren sollten funktionelle Inhibitionsversuche von KDM6B an den Zelllinien CCRF-CEM und Jurkat mögliche neue Angriffspunkte der ALL-Therapie identifizieren. Als Inhibitor kam GSK-J4 zum Einsatz. Kombinationsversuche mit den klassischen Pharmaka Dexamethason und Vincristin sollten einen möglichen Synergismus zeigen.

Folglich sollte diese Arbeit einen Grundstein für die Bedeutung der KDMs in kindlicher ALL legen und dadurch einen ersten Ansatzpunkt zur Etablierung einer neuen KDM-gerichteten Therapie kindlicher Leukämien aufzeigen.

## 4 Material & Methodik

Vor über 25 Jahren wurde in der Kinderklinik Jena begonnen, leukämische Blutzellen von Patienten zu konservieren und mit Krankheitsparametern zu datieren und kartieren. So befinden sich nun fast 100 Proben leukämiekranker Kinder und gesunder Spender in dieser Zellprobenbank. Alle 88 verwendeten Proben wurden vor Beginn der Induktionstherapie gewonnen und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -180 °C gelagert.

### 4.1 Material

Alle hier aufgeführten Materialien, Reagenzien und Kits wurden über die Apotheke des Universitätsklinikums Jena oder direkt über den rechts benannten Hersteller bezogen.

#### 4.1.1 Geräte und Arbeitsmittel

Accu-jet® Pipette Controller	BrandTech® Scientific
BBD 6220 CO2 Brutschrank	Thermo Scientific
BD Falcon™ Rundbodenröhrchen, 5 ml	BD Bioscience
BioPhotometer plus	Eppendorf
Cellstar® Zellkulturplatten 6/12/96 Well	Greiner Bio-One GmbH
Cellstar® Tubes, 15/50 ml	Greiner Bio-One GmbH
Cellstar® Kulturflasche 5/20 ml	Greiner bio-One GmbH
Cellstar® Serologische Pipette, 1/2/5/10 ml	Greiner Bio-One GmbH
Combitips Plus 1,0/2,5/5,0/10,0/25,0 ml	Eppendorf
Durchflusszytometer FACS Canto II®	Becton Dickinson Company
Einfrierautomat TRA-14	Cryoson, Schöllkrippen
Eisbereiter	Nordcap
Eppendorf Reference®	Eppendorf, Hamburg
Fast Real-Time PCR System (7900 HT)	Applied Biosystems
HERA safe KS 12, Sterilwerkbank	HERAEUS Thermo Scientific, Hanau
CO <sub>2</sub> -Inkubator BBD6220 (37 °C; 5 % CO <sub>2</sub> )	HERAEUS Thermo Scientific, Hanau
Kryoröhrchen 2 ml	Greiner Bio-One GmbH

Mikroskop	Carl Zeiss Jena, Leica
Mikrozentrifuge	Labaratory & Medical Supplies
Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer (Improved)	Assistent Germany, Bad Blankenburg
Nitrilhandschuhe	Rösner-Mautby Meditrade
Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems
Pasteur-Plastikpipetten, 3 ml	Greiner Bio One, Ratiolab GmbH
Pipetten Eppendorf Reference variabel 0,5-10, 10-100, 50-200, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 10/200/1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand, Wertheim
Präzisions-Quarzküvette	Hellma, VWR International
Safe Lock Röhrchen 0,5/1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Thermal Reactor	Biometra
Vortex-Genie®2	Scientific Industries, Inc., New York
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Julabo
Zellzähler Counter AC-15	Karl Hecht AG
Zentrifuge Rotanta/TR	Andreas Hettich GmbH&Co.KG Tuttlingen
7900 HT Fast RT-PCR System®	Applied Biosystems
4 °C Kühlschrank, -20 °C Gefrierschrank	

#### 4.1.2 Reagenzien und Kits

BD™Cytometer Setup & Tracking Beads	BD Bioscience
Descosept AF, Desinfektionsmittel	Dr. Schumacher GmbH
Dexamethason, Stammlösung 10mM	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth
DiOC <sub>6</sub> (3) (3'3-Dihexyloxacarbocyaniniodid), Stammlösung: 50 µM	Molecular Probes



Dulbecco's PBS (1x) ohne $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$	PAA Laboratories
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
GSK-J4, Stammlösung: 5mM	Cayman/Biomol
Meliseptol® HBV Desinfektionstücher	B. Braun Melsungen
Mini-Plasco® connect, Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen
Omniscript® RT Kit QIAGEN	QIAGEN
PBS ( <i>phosphate buffered saline</i> )	PAA Laboratories
PeqGold Total-RNA-Kit	PeqLab
Penicillin G/Streptomycin	PAA Laboratories
Propidiumiodid, Stammlösung: 1 mg/ml	SIGMA, St. Louis, USA
RNase OUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen
RPML-1640 mit stabilem Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
TaqMan® Gene Expression Assay (Primer- Sonden, Universal PCR Master Mix)	Applied Biosystems
Triton X-100	SIGMA
Trypanblau 0,5 % (w/v) in PBS	Biochrom AG, Berlin
Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 1x/10x	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Vincristin, Stammlösung: 1 mM	Hexal AG
z-VAD-fmk (Pancaspase-Inhibitor), Stammlösung: 20 mM	Apotheke Universitätsklinikum Jena

#### 4.1.3 Software

BD FACSDiva	BD Bioscience 2000
SPSS Statistics	IBM Version 22
7900 HT SDS 2.2.2	Applied Biosystems

#### 4.1.4 Proben und Zelllinien

##### 4.1.4.1 Patienten- und Knochenmarkspenderproben

Durch andere kürzlich durchgeführte Experimente lag die isolierte komplementäre DNA (cDNA) der verwendeten 88 Patienten- und acht Knochenmarkspenderproben bereits vor. Diese wurde bei -20 °C gelagert.

##### 4.1.4.2 Zelllinien und Medium

Für die Zellkulturexperimente wurden zwei humane T-Zell-Leukämie-Zelllinien verwendet: CCRF-CEM und Jurkat.

Die CCRF-CEM-Zelllinie wurde 1964 aus dem peripheren Blut eines Mädchens mit ALL und terminalem Rezidiv gewonnen. Das Mädchen war kaukasischer Abstammung und zu diesem Zeitpunkt drei Jahre alt. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um runde, teiladhärente Zellen. In Suspension wachsen sie vereinzelt und adhärent als monomolekulare Schicht. (Foley et al. 1965) *Depositor: Dr. H. G. Drexler, ACC 240, Lot 6. - 20.03.2009, DSMZ*

Die Jurkat-Zelllinie wurde 1976 aus dem peripheren Blut eines Jungen mit ALL und erstem Rezidiv etabliert. Der Junge war zu diesem Zeitpunkt 14 Jahre alt. Die runden Jurkat-Zellen wachsen in Suspension einzeln oder in Zellhaufen. (Schneider et al. 1977) *Depositor: Dr. Jun Minowada, ACC 282, Lot 15. - 31.08.2009, DSMZ*

Beide Zelllinien wurden in Kulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit aufbewahrt.

Das für CCRF-CEM und Jurkat verwendete Komplettmedium setzt sich folgendermaßen zusammen:

500 ml	RPMI-1640 [mit stabilem Glutamin]
50 ml	Fetales Kälberserum
100 units pro ml	Penicillin G
0,1 mg/ml	Streptomycin

## 4.2 Methodik

### 4.2.1 Zellkultivierung und -passage

Die verwendeten Zelllinien CCRF-CEM und Jurkat wurden bei -180 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Um diese Zellen in Kultur nehmen zu können,

wurden sie unter ständiger Bewegung im Wasserbad bei 37 °C schnell aufgetaut und anschließend in 15 ml Medium überführt. Es folgte eine dreiminütige Zentrifugation bei 1200 U/min. Der Überstand wurde anschließend verworfen, die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert und in eine 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche überführt. Die Kultur wurde bis zur nächsten Passage im Brutschrank verwahrt.

Die Zellen wurden alle drei bis vier Tage passagiert, bevor die vollständige Konfluenz erreicht wurde. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt und die CCRF-CEM-Zellen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen. Um adhärente Zellen von der Kulturflasche zu lösen, wurden die Zellen danach mit 2,5 ml vorgewärmtem Trypsin/EDTA behandelt und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nachdem sich die Zellen vollständig gelöst hatten, wurde die Reaktion mit 7 ml Medium abgestoppt und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 1200 U/min für drei Minuten wurde der Überstand verworfen und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Die Suspensionszelllinie Jurkat benötigte keine Behandlung mit Trypsin, wurde aber sonst gleich behandelt.

Zur Zellzahlbestimmung wurden 20 µl aus der Zellsuspension entnommen und 20 µl Trypanblau hinzugegeben und gevortext. Damit wurde nun eine mit Deckgläschen bedeckte Neubauerzählkammer gefüllt, und die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Dazu wurden jeweils die Zellen in zwei äußeren, diagonal entgegengesetzten Großquadranten gezählt. Hierbei wurde in tote, mit Trypanblau angefärbte, Zellen und lebende unangefärbte Zellen unterschieden. Die Zellvitalität konnte so berechnet werden:

$$\frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen}}{\text{Anzahl aller Zellen}} \times 100 \% = \text{Zellvitalität}$$

Durch den Aufbau der Zählkammer (Fläche: 1 mm<sup>2</sup>; Höhe: 0,1 mm) ergibt sich pro Großquadrat ein Volumen von 0,1 µl. Multipliziert man die gezählten Zellen mit 10<sup>4</sup> erhält man die Anzahl der Zellen pro ml. Unter Berücksichtigung der Trypanblau-Verdünnung (1:2) und der Anzahl der gezählten Großquadrate (hier 2) ergibt sich folgende Formel für die lebenden Zellen:

$$\frac{\text{gezählte lebende Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Anzahl der gezählten Großquadrate}} = \text{lebende Zellen pro ml}$$

Zur Weiterführung der Zellkultur wurden verschiedene Zellzahlen in die 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche eingesetzt. Für die Zelllinie CCRF-CEM waren es 1,5x10<sup>6</sup> Zellen für vier Tage und 2x10<sup>6</sup> Zellen für drei Tage. Bei Jurkat-Zellen wurden etwas mehr Zellen eingesät: 3x10<sup>6</sup> Zellen für vier Tage und 4x10<sup>6</sup> Zellen für drei Tage.

### **4.2.2 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Real-Time-PCR**

Zur KDM-Expressionsanalyse mit Hilfe von quantitativer Real-Time-Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden die cDNAs von Patienten- und Spenderproben verwendet, die bereits von Rebekka Herrmann präpariert worden waren. Diese wurden bei -20 °C gelagert, zur Verwendung rasch aufgetaut und anschließend auf einem Eisblock bei 4 °C bearbeitet.

Außerdem wurden für die zwei vorrätigen Zelllinien Jurkat und CCRF-CEM jeweils eine Expressionsanalyse für KDM6B durchgeführt. Hierfür musste zunächst die RNA isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben werden, bevor die Genexpression mittels Real-Time-RT-PCR erfolgen konnte.

#### **4.2.2.1 RNA-Isolation und Reverse Transkription der Zelllinien**

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem PegGold-Total-RNA-Kit®. Vor der RNA-Isolation wurden je 200.000 Zellen pro Well auf eine 6-Well-Kulturplatte ausgesät und nach 24-stündigem Wachstum wieder geerntet. Alle Arbeitsschritte wurden gleichermaßen für beide Zelllinien durchgeführt, wobei nur CCRF-CEM-Zellen vor der Ernte mit Trypsin/EDTA inkubiert wurden. Um die geernteten Zellen vom Medium zu trennen wurden die Zellsuspension für drei Minuten bei 1800 U/min zentrifugiert. Das trockene Zellpellet wurde auf Eis weiterverarbeitet. Nach der Zugabe von je 400 µl RNA-Lysis-Buffer-T wurde das gesamte Lysat auf eine DNA-Removing-Säule gegeben und anschließend für zwei Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert. Nun wurde die Säule verworfen, der Unterstand mit 400 µl 70%-igem Ethanol vermischt und auf eine PerfectBind-RNA-Säule gegeben. Es folgte eine einminütige Zentrifugation bei 13000 U/min. Danach befand sich die RNA im Filter der Säule, der Unterstand wurde verworfen. Daraufhin wurden 500 µl RNA-Washbuffer-I fünf Minuten auf der Säule belassen, wieder für 15 Sekunden bei

13000 U/min zentrifugiert und der Säulendurchfluss verworfen. Die Säule wurde danach für 15 Minuten mit 75 µl DNase-Verdau, bestehend aus 1,5 µl DNase I und 73,5 µl DNase Digestionbuffer I, behandelt, um DNA-Kontaminationen zu vermeiden. Anschließend wurden noch einmal 350 µl RNA-Washbuffer-I auf die Säule gegeben, 15 Sekunden bei 13000 U/min zentrifugiert und wiederum der Säulendurchfluss verworfen. Danach wurden 500 µl RNA-Washbuffer-II auf die Säule pipettiert, für 15 Sekunden bei gleicher Geschwindigkeit zentrifugiert und der Unterstand verworfen. Dies wurde mit demselben Volumen RNA-Washbuffer-II und zweiminütiger Zentrifugation bei 13000 U/min wiederholt. Zum Schluss wurden 40 µl RNase-freies Wasser auf die PerfectBind-Säule pipettiert und dies ein letztes Mal für eine Minute bei 13000 U/min zentrifugiert um die RNA zu eluieren. Im Unterstand der Säule wurde so die RNA der einzelnen Zelllinien aufgefangen und auf Eis weiterverarbeitet.

Um die isolierte RNA zu quantifizieren, wurde eine photometrische Messung durchgeführt. Vorbereitend dafür wurde das Photometer mit RNase-freiem Wasser kalibriert. Entsprechend dem Verdünnungsfaktor wurden anschließend je 4 µl RNA und 76 µl RNase-freies Wasser in einer standardisierten Quarzküvette in das Photometer gestellt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Absorption bei 260 nm ( $A_{260nm}$ ) gemessen. Diese Wellenlänge entspricht dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Eine Absorptionseinheit entspricht 40 µg RNA pro ml. Somit kann man die RNA-Konzentration wie folgt berechnen:

$$\text{RNA-Konzentration } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260nm} \times 0,04 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Durch eine weitere photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 280 nm, die dem Absorptionsmaximum von Proteinen entspricht, kann man die Reinheit der Nukleinsäure-Lösung abschätzen. Dafür wird der Quotienten  $A_{260nm}/A_{280nm}$  berechnet. Liegt dieser zwischen 1,8 und 2,0, ist von reiner RNA ohne Proteinverunreinigungen auszugehen und die RNA kann weiterverarbeitet werden.

Zur Genexpressionsanalyse mit Hilfe der PCR benötigt man cDNA. Daher war es vorher notwendig, die isolierte RNA der Zelllinien mit Hilfe des Enzyms

Reverse Transkriptase in cDNA umzuschreiben. Die Reverse Transkriptase arbeitet zunächst als RNA-abhängige DNA-Polymerase, die entlang des RNA-Strangs komplementäre DNA synthetisiert. Durch die integrierte RNase H-Funktion wird der hybridisierte RNA-Strang abgebaut. Abschließend wird durch die zusätzliche DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität des Enzyms die Doppelstrang-cDNA fertiggestellt.

Die Reverse Transkription (RT) wurde mit einem Omniscript® Kit der Firma QIAGEN durchgeführt. Hierbei wurden 0,5 µg RNA jeder Zelllinie mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 13 µl aufgefüllt. Zu jeder dieser Proben wurden dann je 7 µl des folgenden Mix hinzu pipettiert.

Omniscript-Mix (je Probe aus dem QIAGEN Omniscript® RT Kit anzusetzen):

- 2 µl 10x Buffer-RT
- 2 µl dNTP-Mix
- 2 µl Random-Hexamer
- 0,25 µl RNase-Out (Invitrogen)
- 1 µl Omniscript-RT

Es folgte eine einstündige Inkubationszeit bei 37 °C in einem Heizblock. Als Primer für die RT dienten die eigens synthetisierten Random-Hexamer-Oligonukleotide. Das verwendete RNase-Out-Reagenz der Firma Invitrogen hemmte während des Prozesses die Zerlegung der RNA durch RNasen. Die erhaltenen cDNAs wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### **4.2.2.2 TaqMan®-Real-Time-PCR**

Zur Quantifizierung der Genexpression wurden die bereits isolierten cDNAs der Patienten- und Spenderproben verwendet. Diese wurden zunächst im Verhältnis 1:8 mit sterilem Wasser verdünnt, um eine ausreichende Menge für die PCR zu schaffen. Anschließend wurde für jede einzelne KDM eine quantitative Real-Time-PCR wie folgt durchgeführt.

Das Prinzip der quantitativen Real-Time-PCR beruht auf dem der herkömmlichen PCR: Auch hier kommt es durch Temperaturerhöhung auf über 90 °C zur Denaturierung der dsDNA in Einzelstränge. Durch eine Temperaturregulation kann sich anschließend eine Primer-Sonde anlagern

und die Elongation durch die temperaturbeständige Taq-Polymerase starten. Bei der Real-Time-PCR kommt es durch eine Fluoreszenzmessung in Echtzeit zusätzlich zur Quantifizierung der gewonnenen DNA. Dies wird ermöglicht durch besondere fluorogene Sonden. Diese besitzen am 5'-Ende einen sogenannten Quencher- und am 3'-Ende einen Reporterfarbstoff. Durch ein besonderes Energieübertragungssystem inhibiert dabei der Quencher das Fluoreszenzsignal des Reporters, sofern die Sonde intakt ist und beide Farbstoffe sich räumlich nah sind. Die Taq-Polymerase, die während der Elongation kontinuierlich Nukleotide anlagert, wirkt außerdem auch als 5'-3'-Exonuklease und entfernt am Ende jeder Elongation den Quencherfarbstoff am 5'-Ende. Dadurch wird das Fluoreszenzsignal des Reporters nicht mehr unterdrückt. Die Fluoreszenz steigt proportional zu den PCR-Produkten und erlaubt Rückschlüsse auf die amplifizierte DNA-Menge. (Haras und Amoros 1994, Holland et al. 1991)

Für die KDM-Expressionsanalyse wurden einmal für jede KDM Doppelbestimmungen durchgeführt. Vorbereitend für die PCR wurde jeweils ein 0,5 ml Safe-Lock-Tube mit 50 µl Reaktionsmix zur Doppelbestimmung gefüllt. Dieser wurde jeweils angesetzt für alle Patienten- und Knochenmarkspenderproben, einen Pool aller Knochenmarkspender, die Negativkontrolle sowie für das Referenzgen  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2$ M).

Der Reaktionsmix ergab sich für jede Probe aus:

11,25 µl sterilem Wasser

12,50 µl Universal PCR Mastermix

1,25 µl Primer-Sonden-Mix (Lysin-Demethylasen: FAM-Fluoreszenzfarbstoff,  $\beta_2$ M: VIC-Fluoreszenzfarbstoff).

Anschließend wurden die verdünnten cDNA-Proben aufgetaut und kurz an zentrifugiert. Dann wurden je 2 µl cDNA zu den 50 µl Reaktionsmix hinzugefügt, anschließend wieder kurz gevortext und an zentrifugiert. Zur Doppelbestimmung jeder Probe wurden jeweils 25 µl in zwei Wells einer 96-Well-Platte pipettiert und diese mit einer Folie versiegelt. Jeder dieser Schritte wurde kontinuierlich auf Eis durchgeführt. Die 96-Well-Platte wurde ein letztes Mal an zentrifugiert. Danach wurde die quantitative Real-Time-PCR mit der

7900 HT Fast Real-Time PCR Anlage der Firma Applied Biosystem durchgeführt und mit der Software SDS 2.2.2 aufgezeichnet.

Während der quantitative Real-Time-PCR wird mit Hilfe eines Detektors am Thermocycler die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs nach jedem PCR-Zyklus gemessen. Die Fluoreszenz ist dabei proportional zur amplifizierten DNA-Menge. Durch das Auftragen der einzelnen Fluoreszenzwerte ( $\Delta RN$ ) zur Zykluszahl ergibt sich für jede Probe eine Amplifikationskurve. Diese ist anfangs sehr flach, da die PCR-Produkte die Hintergrundfluoreszenz der Sonden (engl. *Baseline*) nicht überschreiten. Mit zunehmender Zykluszahl entwickelt sich zunehmend eine exponentielle Vermehrung der DNA, die sich in einem steilen Kurvenverlauf widerspiegelt. Durch Enzymschöpfung und Substratverbrauch flacht dieser Kurvenverlauf zum Ende der PCR wieder ab. Insgesamt erhält man eine sigmoide Amplifikationskurve für jede Probe. Dabei sollten die Kurven jeder Doppelbestimmung idealerweise identisch sein. Mit Hilfe der Auswertungssoftware wird der Verlauf jede Amplifikationskurve verrechnet. Das Ergebnis ist der sogenannte Cycle-Threshold Value ( $C_T$ -Wert), der die Zyklusanzahl angibt, bei der die Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert (engl. *Cycle Threshold*) überschreitet. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Schwellenwert bei 0,2 gelegt. Das heißt, je höher der  $C_T$ -Wert, desto mehr PCR-Zyklen wurden benötigt um den Schwellenwert zu überschreiten und umso weniger cDNA ist in den Proben vorhanden. Dementsprechend hat jede Probe einen eigenen  $C_T$ -Wert. Zur Quantifizierung wurden die  $C_T$ -Werte für die Doppelbestimmungen gemittelt und nach der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode verrechnet. Bei dieser Methode werden zwei Differenzen als negativer Exponent zur Basis 2 berechnet. Eine dieser Differenzen ergibt sich durch die Normalisierung der gemittelten  $C_T$ -Werte der verschiedenen KDMs zu den gemittelten  $C_T$ -Werten des ubiquitär vorkommenden Referenzgens  $\beta_2M$ :

$$\Delta C_{T\text{Ziel}} = C_{T\text{Wert KDM}} - C_{T\text{Wert } \beta_2M}$$

Die zweite Differenz repräsentiert die Normalisierung der  $C_T$ -Werte bei gesunden Knochenmarkspendern. Dazu wurden die acht verwendeten Spenderproben gepoolt:



$$\Delta C_T \text{Kontrolle} = C_T \text{Wert Knochenmarkpool} - C_T \text{Wert } \beta_2 M$$

Die Knochenmarkpoolwerte wurden als Bezugswerte gleich eins bzw. 100 % gesetzt. Somit ergeben sich die Expressionshöhen jeder KDM in den Patientenproben als Vielfaches der Expressionshöhen in gesunden Spenderproben nach folgender Formel:

$$2^{-(\Delta C_T \text{Ziel} - \Delta C_T \text{Kontrolle})}$$

#### 4.2.3 Wirkstoffbehandlung der Zellen

Aufgrund der Ergebnisse der KDM-Expressionsanalysen wurden Zellkulturexperimente angeschlossen. Dabei wurden die Zellen mit dem KDM6-Inhibitor GSK-J4 und Standardtherapeutika Dexamethason und Vincristin behandelt. Es wurden je drei unabhängige Versuche durchgeführt. Die Wirkstoffapplikation erfolgte jeweils 24 h nach dem Aussäen der Zellen auf 12-Well-Platten. Die Chemotherapeutika wurden in verschiedenen Konzentrationen appliziert, die zuvor in eigenen Vorversuchen ermittelt wurden. Die Verdünnungsreihen wurden mit Medium angesetzt. Bei den Versuchen mit dem Pan-Caspaseinhibitor z-VAD-fmk erfolgte die Behandlung eine Stunde vor der eigentlichen Chemotherapeutikabehandlung. Die Kontrollen wurden entsprechend mit DMSO statt z-VAD-fmk behandelt. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank 72 h bis zu den durchflusszytometrischen Analysen inkubiert.

Die Wirkstoffapplikation erfolgt in folgenden Konzentrationen:

z-VAD-fmk:	20 µM
GSK-J4:	0/0,5/0,75/1,25/1,75/2,5 µM
Dexamethason:	0/0,2/0,3/0,5/0,7/1 µM
Vincristin:	0/1/1,5/2,5/3,5/5 nM

#### 4.2.4 Durchflusszytometrie

##### 4.2.4.1 Grundlagen

Für die Evaluierung der Chemotherapeutikawirkung wurden mittels Durchflusszytometrie der Zelltod und Verlust des mitochondrialen Membranpotentials gemessen.

Bei der Durchflusszytometrie, auch FACS-Analyse (engl. *fluorescence activated cell sorting*) genannt, werden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Zellen einzeln an einem Laserstrahl vorbei geleitet und beleuchtet. Das dabei entstehende Fluoreszenz- und Streulicht jeder Zelle wird an einem Photodetektor erfasst. Die Photodetektoren leiten die Fluoreszenzsignale weiter und verarbeiten diese zu elektrischen Signalen. So können die Zellen nach ausgewählten Kriterien sortiert und quantifiziert werden. Das entstehende Fluoreszenzlicht, das sogenannte Vorwärtstreulicht (engl. *forward scatter*, FSC) gibt dabei Auskunft über die Größe der Zellen. Das seitliche Streulicht (engl. *sideward scatter*, SCC) lässt auf die Granularität des Zytoplasmas, des Zellkerns und der Vesikel schließen. (Jaroszeski und Radcliff 1999)

In dieser Arbeit wurden die Messungen am Gerät FACSCanto™ II der Firma Becton Dickinson GmbH durchgeführt und diese mit Hilfe der BD FACSDiva Software (BD Bioscience, 2000) ausgewertet. Zur Auswertung wurden jeweils drei Dotplots und zwei Histogramme erstellt. In den Dotplots wurden alle Zellen je nach gemessenen Fluoreszenz- und Streusignalen in einem Koordinatensystem als Punkte dargestellt. Dabei wurden jeweils die gemessenen Signale zueinander aufgetragen: FSC zu SSC und FSC zu den jeweiligen Farbstoffen. Um Zelltrümmer, Verunreinigungen und Zellhaufen auszuschließen, wurde bei allen Plots ein *Gating* der Zellpopulation eingefügt, sodass nur komplette vereinzelte Zellen in die Auswertung mit einbezogen wurden.

Um die Funktionalität und Integrität der Zellen beurteilen zu können, wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie nach ihrem mitochondrialen Membranpotential ( $\Delta\psi_m$ ) sortiert und beurteilt. Um dieses beurteilen zu können, wurden die Zellen 45 Minuten mit dem Farbstoff DiOC<sub>6</sub>(3) (3'3-Di-hexyloxacarbocyaniniodid) vorinkubiert. DiOC<sub>6</sub>(3) ist ein grünfluoreszierender, lipophiler Farbstoff, der die Zellmembran überwinden kann und sich aufgrund seiner positiven Ladung in die negativ geladene mitochondriale Membran einlagern kann. Da sich die Ladung der mitochondrialen Membran während des Zelltods verändert, kann sich der Farbstoff nur in lebenden Zellen mit intaktem  $\Delta\psi_m$  anreichern. Sein Absorptionsmaximum liegt bei 484 nm und das Emissionsmaximum bei ca. 520 nm. Im Histogramm wurden die Regionen so

gesetzt, dass man den Anteil der ungefärbten, apoptotischen Zellen in % von der Gesamtzellzahl ablesen kann.

Für die Zelltodanalyse wurde ein anderer Farbstoff gewählt, das Propidiumiodid (PI). Dieser Farbstoff kann nur Zellmembranen überwinden, die bereits perforiert sind und interkaliert so in den DNA-Strängen toter Zellen. Mit PI gefärbte Zellen repräsentieren daher tote Zellen. Sein Absorptionsmaximum liegt bei 536 nm und das Emissionsmaximum liegt bei 617 nm.

Bei der Verwendung von zwei Fluoreszenzfarbstoffen gleichzeitig kann es zu einer Überlappung der Fluoreszenzspektren kommen. Unter diesen Umständen können Messungen zu einer falsch positiven Zellpopulation in dem entsprechenden Fluoreszenzspektrum führen. Um diese Messfehler zu vermeiden, musste gemessen werden, wie stark jeder Farbstoff im Spektrum des anderen Farbstoffs streut. Aufgrund dieser Messwerte konnte dann eine Korrektur, die sogenannte Kompensation, rechnerisch durchgeführt werden. Dafür wurden Zellen ausgesät, die bewusst nicht behandelt wurden und nur für die Berechnung der Kompensation verwendet wurden. (Jaroszeski und Radcliff 1999) Diese Zellen wurden zusätzlich zu den anderen Zellen auf eine 12-Well-Kulturplatte ausgesät. Zur Kompensationsmessung wurde ein Well 45 Minuten vor der Ernte mit 1 µl DiOC<sub>6</sub>(3) behandelt und vorinkubiert. Nach der Ernte wurden bei einer anderen Probe 55 µl 0,5%-iges Triton X-100 hinzugefügt. Dies soll künstlich einen Zelltod simulieren, sodass sich durch Zugabe von PI die toten Zellen erkennen ließen. Für die Kompensationsberechnung wurde außerdem eine Negativkontrolle, die gänzlich ungefärbt blieb, mitgeführt.

#### **4.2.4.2 Vorbereitung und Durchführung der FACS-Analyse**

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden je 130.000 Zellen pro Well einer 12-Well-Platte für die 72 h-Behandlung ausgesät. In einem 50 ml-Röhrchen wurde das entsprechende Volumen an frischem Medium vorgelegt und das errechnete Zellvolumen hinzu pipettiert. Anschließend wurde mittels Multipette je 1 ml dieser Zellsuspension pro Well pipettiert und im Brutschrank bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit für 24 h inkubiert. Es folgte die 72 h-Behandlung.

Vorbereitend wurde anschließend in jedes Well DiOC<sub>6</sub>(3) gegeben und eine halbe Stunde vorinkubiert. Danach wurden die Zellen wie folgt von den 12-Well-Kulturplatten geerntet: Zuerst wurden die Zellen aus jedem Well in je ein FACS-Röhrchen überführt. Dann wurde jedes Well mit 1 ml PBS gespült und das gespülte PBS wiederum in das FACS-Röhrchen pipettiert. Für die CCRF-CEM-Zelllinie folgte nun eine kurze Inkubationszeit von 15 Minuten unter Trypsin/EDTA-Behandlung im Brutschrank bei 37 °C. Nach dieser Inkubation wurden beide Zelllinien je zweimal mit 1 ml PBS gespült und die FACS-Röhrchen anschließend bei 1200 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Die zentrifugierten Proben wurden direkt auf Eis weiterverarbeitet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in je 500 µl PBS vereinzelt. Kurz vor der Messung wurden erst die Kompensationen bestimmt, die dann auf alle Messungen angewandt wurden. Anschließend wurde zu jeder Probe ca. 30 sec vor der Messung PI hinzugegeben und die FACS-Analyse am Gerät FACSCanto™ II durchgeführt.

### **4.2.5 Statistische Analyse der Daten**

Die statistische Auswertung der KDM-Expressionshöhen bei Patientenproben, Knochenmarksproben und Zelllinien sowie die Korrelationsanalysen von KDM-Expressionslevel und klinischen Parametern erfolgten mit der Software IBM SPSS Statistics, Version 22.

Die P-Werte der signifikanten KDM-Expressionshöhen wurden nach der Holm-Bonferroni-Methode korrigiert. (Holm 1979) Für die Korrelationsanalysen wurden für zwei Variablen entsprechend der Mann-Whitney-U-Test angewandt. (Mann und Whitney 1947) Bei mehr als drei Variablen kam der Kruskal-Wallis-Test zum Einsatz. (Kruskal und Wallis 1952)

Die Kombinationsexperimente wurden mit Hilfe des Kombinationsindex (CI-Werte) nach Chou und Talalay ausgewertet. Dabei wurde unterschieden in Synergismus ( $CI < 1$ ), Antagonismus ( $CI > 1$ ) und einen additiven Effekt ( $CI = 1$ ). (Chou 2006)

## 5 Ergebnisse

### 5.1 KDM-Expression in ALL-Patientenproben

#### 5.1.1 Patientenproben

Seit Jahren werden in der Kinderklinik Jena Leukämieproben von Patienten, einschließlich der korrespondierenden Krankheitsverläufe und klinischen Parameter, gesammelt und archiviert. Bei allen 88 verwendeten Patientenproben (40 weibliche, 48 männliche) wurde zwischen 1991 und 2012 eine primäre ALL diagnostiziert. Die Kinder waren zu diesem Zeitpunkt zwischen drei Monaten und 17 Jahren alt (Median des Alters: 7,04 Jahre). Darunter war ein Junge jünger als 12 Monate, 58 Kinder zwischen einem und neun Jahren alt und 29 Patienten älter als neun Jahre. Nach Diagnosestellung mittels Knochenmarkausstrich erfolgte eine Risikostratifizierung nach den ALL-Berlin-Frankfurt-Münster (BFM)-Studienkriterien in Standard-Risiko (n=21), mittleres Risiko (n=41) und hohes Risiko (n=20), 6 Daten hierzu fehlten. Die Einteilung in diese Risikogruppen erfolgte nach dem Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, der initialen Leukozytenzahl, dem Immunophänotyp, dem Therapieansprechen im Allgemeinen und dem Ansprechen auf Prednison im Besonderen. Zur Beurteilung von Letzterem wurde nach einer siebentägigen Prednison-Monotherapie und einmaliger intrathekaler Methotrexatgabe die Reduktion der Blasten im peripheren Blut gemessen. Ein Rückgang der Blasten unter 1000/ $\mu$ l am 8. Behandlungstag definierte ein gutes Ansprechen auf Prednison. (Moricke et al. 2008) Hierbei sprachen 74 Kinder gut auf Prednison an, 11 dagegen schlecht (3 Daten fehlend). Das Therapieansprechen im Allgemeinen wurde durch das Erreichen der Remission beurteilt. Diese ist gekennzeichnet durch eine Reduktion der Blasten auf unter 5 % im regenerierten Knochenmark sowie das Fehlen von Blasten im Blut und Liquor. (Moricke et al. 2008) In der Phänotypisierung wurde bei 64 Patienten eine B-ALL diagnostiziert und bei 22 eine T-ALL (2 Daten fehlend). Die Patienten wurden zwischen einem und 169 Monaten nachbeobachtet. Während dieser Zeit zeigte sich bei neun Kindern ein Rezidiv, 16 benötigten eine Knochenmarktransplantation und 12 verstarben.

Weitere wichtige klinisch-pathologische Parameter sowie deren Auftreten im Patientenkollektiv sind in Tabelle 6 (s. Seite 64) zusammengefasst.

### 5.1.2 Quantitative KDM-Expressionsanalyse bei ALL-Patienten und gesunden Knochenmarkspendern

Die mRNA-Expressionsanalyse der zehn ausgewählten KDMs erfolgte an 88 ALL-Patientenproben, die mit einem Pool aus acht Proben gesunder Knochenmarkspender verglichen wurden. Dazu wurde jeweils ein Probenpool der gesunden Knochenmarkspender bei der RT-PCR mitgeführt und gleich eins bzw. 100 % gesetzt. Hierbei zeigte sich, dass KDM1A ( $P < 0,001$ ) und KDM4A ( $P = 0,001$ ) in den Proben der ALL-Patienten nach Korrektur mit der Holm-Bon-

ferroni-Methode signifikant höher exprimiert waren, als in denen der gesunden Spender.

Zusätzlich zeigten auch KDM2B ( $P = 0,019$ ), KDM5B ( $P = 0,032$ ) und KDM6A ( $P = 0,043$ ) einen Trend zur höheren Expression bei erkrankten Patienten.

Dagegen war KDM6B die einzige Demethylase, die bei gesunden Spendern signifikant höher exprimiert war ( $P < 0,001$ , s. Abb. 1).

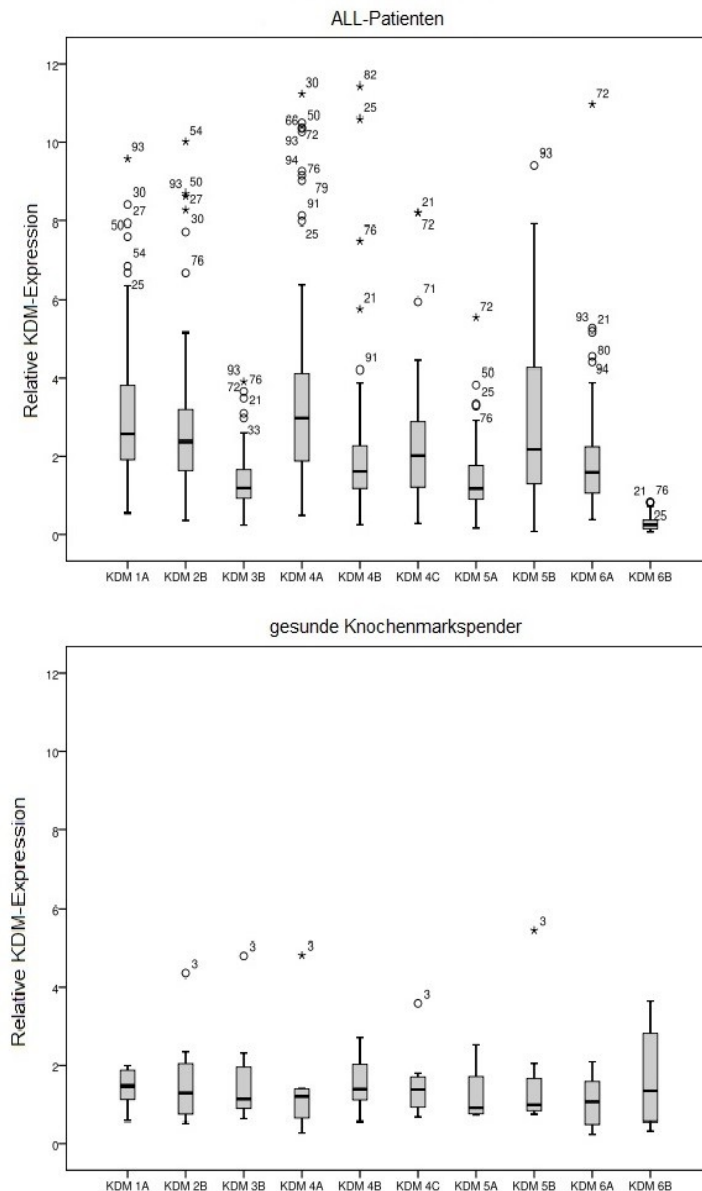


Abb. 1: Relative KDM-Isoenzym-Expression bei ALL-Patienten und gesunden Knochenmarkspendern

### **5.1.3 Korrelation der KDM-Expressionshöhen mit den korrespondierenden klinisch-pathologischen Parametern**

Nach der mRNA-Expressionsanalyse wurden alle Ergebnisse mit den klinischen Verläufen der Patienten in Verbindung gesetzt. Hierbei wurden die mRNA-Expressionshöhen der einzelnen KDM's vor allem mit den Faktoren Erkrankungsalter, Ansprechen auf Prednisonbehandlung, Immunophänotyp, initiale Leukozytenzahl, Hyperdiploidie und dem Vorliegen einer TEL/AML1-Mutation in Verbindung gesetzt. Ein schlechtes Therapieergebnis wird begünstigt durch ein Alter unter einem oder über neun Jahren zum Diagnosezeitpunkt, schlechtes Prednisonansprechen, einer Leukozytenzahl > 50.000/ $\mu$ l und einem T-Zell-Phänotyp. Hyperdiploidie und TEL/AML1-Fusion sind hingegen prognostisch günstig. (Pui et al. 2008) Zur Verlaufsbeurteilung wurden die KDM-Expressionen mit dem Auftreten von Rezidiven, dem Bedarf einer Knochenmarktransplantation oder dem Tod korreliert. Alle Ergebnisse wurden mittels Mann-Whitney-U-Test oder Kruskal-Wallis-Test berechnet und die P-Werte anschließend durch die Holm-Bonferroni-Methode evaluiert. Die Korrelationsergebnisse mit dazugehörigen P-Werten sind in Tabelle 6 (s. Seite 64) zu finden.

Die häufigsten signifikanten Korrelationen erhöhter KDM-Expression ergab die Analyse bezüglich Alter unter einem oder über neun Jahren, einem der stärksten Prognoseparameter. Hier waren die folgenden sechs KDMs signifikant höher ausgeprägt: KDM1A ( $P < 0,001$ ), KDM2B ( $P = 0,005$ ), KDM4A ( $P < 0,001$ ), KDM5A ( $P = 0,008$ ), KDM5B ( $P < 0,001$ ) und KDM6B ( $P = 0,002$ ). Eine siebte KDM, KDM3B, zeigte außerdem einen Trend zur erhöhten Expression ( $P = 0,024$ ).

Auch die Korrelationsanalyse von Prednisonansprechen, Immunophänotyp und initialer Leukozytenzahl zeigten zahlreiche signifikante Ergebnisse. Bei der Korrelation mit dem Ansprechen auf Prednison ergaben sich signifikante Ergebnisse für KDM1A ( $P = 0,002$ ), KDM2B ( $P < 0,001$ ), KDM5B ( $P = 0,006$ ) und KDM6B ( $P = 0,004$ ).

Eine erhöhte KDM-Expression war bei KDM2B ( $P < 0,001$ ) und KDM6B ( $P = 0,004$ ) mit einer T-Zell-ALL assoziiert, bei KDM4B dagegen mit einer B-Zell-ALL ( $P = 0,003$ ). KDM4A ( $P = 0,079$ ), KDM4C ( $P = 0,05$ ) und KDM5B ( $P = 0,035$ ) zeigten Trends zur erhöhten Expression bei Patienten mit T-ALL.

Bezüglich der Leukozytenzahl über 50.000/ $\mu$ l waren KDM1A ( $P=0,005$ ), KDM2B ( $P<0,001$ ), KDM5A ( $P=0,006$ ) und KDM5B ( $P=0,002$ ) signifikant erhöht. KDM3B ( $P=0,025$ ), KDM4A ( $P=0,009$ ), KDM4C ( $P=0,022$ ), KDM6A ( $P=0,099$ ) und KDM6B ( $P=0,028$ ) zeigten dafür nur einen Trend.

Weitere Trends fanden sich bei den prognostisch günstigen Parametern TEL/AML 1-Mutation für KDM2B ( $P=0,067$ ) und KDM4B ( $P=0,029$ ), sowie Hyperdiploidie für KDM3B ( $P=0,097$ ), KDM4A ( $P=0,072$ ) und KDM6B ( $P=0,016$ ). KDM6A war als einziges Enzym bei männlichen Patienten signifikant erhöht ( $P=0,004$ ).

In der Verlaufsanalyse korrelierten KDM1A ( $P=0,072$ ) und KDM6B ( $P=0,026$ ) mit ungünstigen Verläufen im Sinne von Rezidiven, Knochenmarktransplantationen oder Tod. Für KDM3B und -4C konnten hingegen keine Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern festgestellt werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde KDM6B für die anschließenden Zellkulturexperimente zur Inhibition ausgewählt, um ihre therapeutische Relevanz zu untersuchen. Die Expressionswerte dieser KDM korrelierten mit den meisten ungünstigen Prognosemarkern signifikant bzw. zeigten einen Trend zur Signifikanz.

### **5.2 KDM-Expressionsanalyse an ausgewählten Zelllinien**

Für die ausgewählten Zelllinien CCRF-CEM und Jurkat erfolgte genau wie für die Patienten- und Spenderproben eine KDM-Expressionsanalyse. Hier allerdings nur für das ausgewählte Enzym KDM6B. Dabei zeigten sich höhere Werte als bei den ALL-Patienten für KDM6B (s. Abb. 2).

Zur weiteren Analyse der KDM-Wirkung folgten Zelllinienexperimente an den T-Zelllinien CCRF-CEM und Jurkat. Hierbei galt es die Toxizität von KDM6B-Inhibitoren zu evaluieren. Dazu wurden die Zellen mit Dexamethason und Vincristin, jeweils alleine, und in Kombination mit dem KDM6B-Inhibitor GSK-J4 behandelt. Dexamethason, ähnlich wie Prednison, und Vincristin gehören zu den Standardtherapeutika der ALL. (Pui et al. 2011) GSK-J4 dagegen ist ein Ethylester-Prodrug von GSK-J1, und wirkt als spezifischer Inhibitor von KDM6B. (Kruidenier et al. 2012)



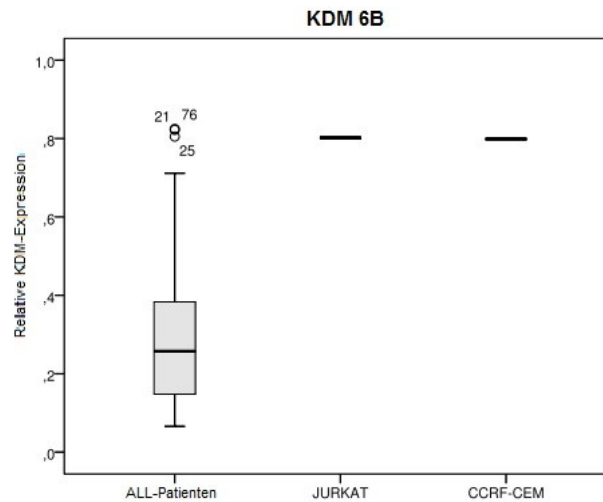


Abb. 2: Relative Expression von KDM6B bei ALL-Patienten, Zelllinie Jurkat und Zelllinie CCRF-CEM

### 5.3 Experimente an CCRF-CEM-Zellen

Für alle Experimente wurden die CCRF-CEM-Zellen jeweils in aufsteigenden Konzentrationen mit Dexamethason, Vincristin und GSK-J4 für 72 h behandelt. In verschiedenen Vorversuchen (Daten werden nicht gezeigt) ergaben sich folgende Konzentrationen: Für Dexamethason 0; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7; 1  $\mu$ M; für Vincristin 0; 1; 1,5; 2,5; 3,5; 5 nM und für GSK-J4 0; 0,5; 0,75; 1,25; 1,75; 2,5  $\mu$ M. Somit blieb die Ratio der verschiedenen Zytostatika untereinander während der Kombinationsbehandlung mit GSK-J4 immer gleich. 72 h nach Behandlung wurden Zelltod und Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\psi_m$ ) durchflusszytometrisch bestimmt.

#### 5.3.1 Kombinationsbehandlung: GSK-J4 mit Dexamethason

Bei der alleinigen Behandlung der CCRF-CEM-Zellen mit Dexamethason zeigte sich keine nennenswerte Wirkung, weder eine Steigerung des Zelltods, noch ein zunehmender Verlust des  $\Delta\psi_m$  (s. Abb. 3A, Abb. 4A). Die Behandlung mit GSK-J4 ergab einen Anteil toter Zellen von bis zu 25 % (s. Abb. 3B), bezüglich des  $\Delta\psi_m$  zeigte sich sogar ein Verlust von bis zu 35 % (s. Abb. 4B). Betrachtet man nun die Kombinationsbehandlung von Dexamethason mit GSK-J4, sieht man eine deutliche Steigerung des Zelltods bis auf 40 % (s. Abb. 3C), verglichen mit der alleinigen GSK-J4-Behandlung. Ähnlich steigt auch der Verlust des  $\Delta\psi_m$  bis auf 55 % an (s. Abb. 4C).

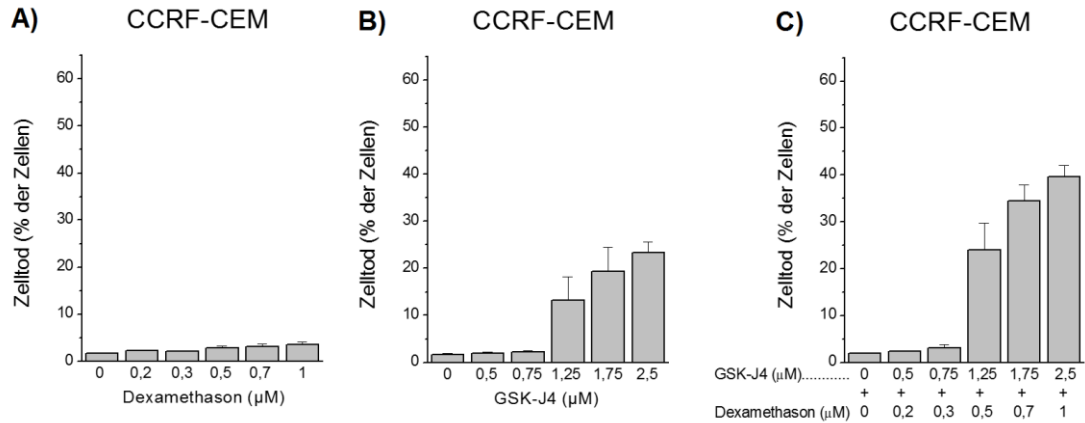


Abb. 3: Zelltod in CCRF-CEM-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit A) Dexamethason, B) dem KDM6B-Inhibitor GSK-J4, C) Kombinationsbehandlung von GSK-J4 und Dexamethason

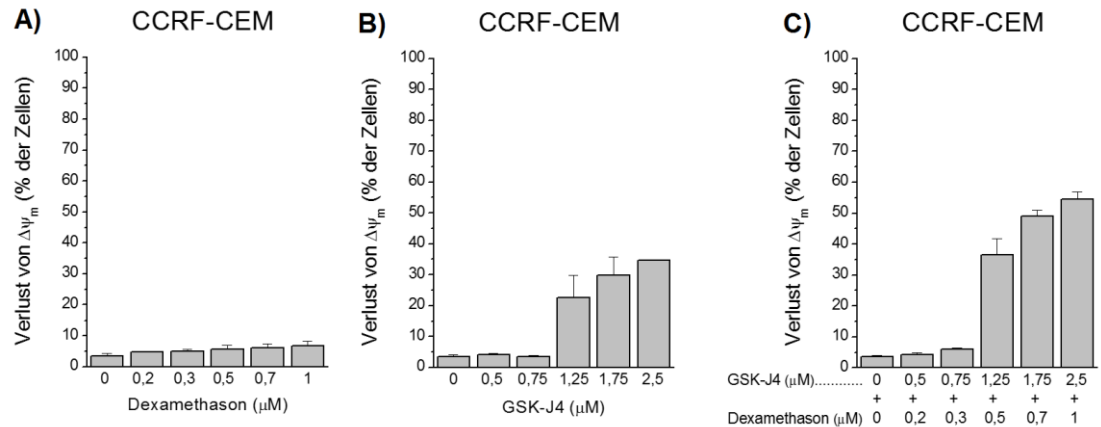


Abb. 4: Verlust des  $\Delta\psi_m$  in CCRF-CEM-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit A) Dexamethason, B) dem KDM6B-Inhibitor GSK-J4, C) Kombinationsbehandlung von GSK-J4 und Dexamethason

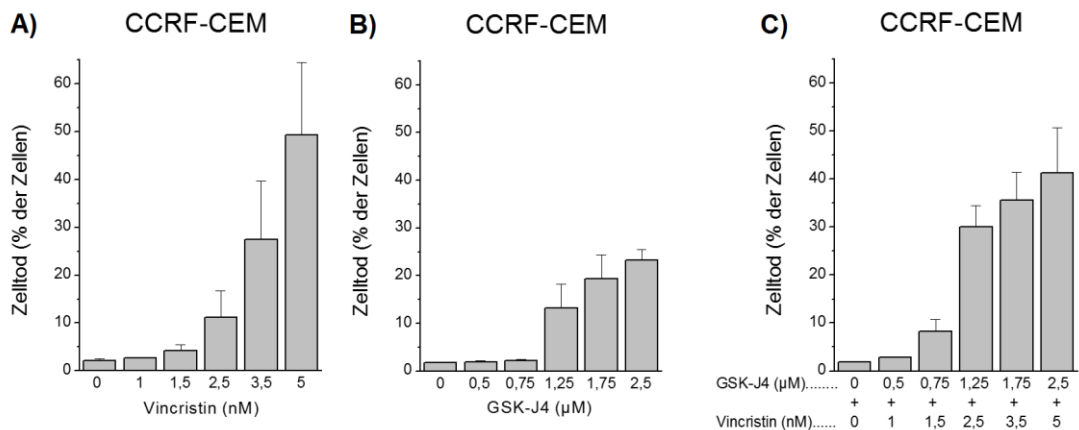
Die statistische Überprüfung der Ergebnisse mit Hilfe des Chou-Talalay-Kombinationsindex (CI-Wert) zeigt Werte  $<1$ , d.h. einen deutlichen Synergismus beider Substanzen, ab der dritten Konzentrationsreihe mit Konzentrationen von 1,25  $\mu$ M GSK-J4 und 0,5  $\mu$ M Dexamethason (s. Tabelle 2).

GSK-J4 ( $\mu\text{M}$ )	Dexamethason ( $\mu\text{M}$ )	CI-Wert
0,5	0,2	1,621
0,75	0,3	1,516
1,25	0,5	0,561
1,75	0,7	0,605
2,5	1	0,772

*Tabelle 2: Chou-Talalay-Kombinationsindex (CI-Wert) für Kombinationsbehandlung von GSK-J4 mit Dexamethason bei CCRF-CEM-Zellen. Bedeutung des Kombinationsindex:  $CI > 1$  Antagonismus,  $CI < 1$  Synergismus,  $CI = 1$  rein additiver Effekt*

### 5.3.2 Kombinationsbehandlung: GSK-J4 mit Vincristin

Die Behandlung der CCRF-CEM-Zellen mit Vincristin zeigte bereits in der Einzelbehandlung Werte von bis zu 50 % Zelltod (s. Abb. 5A) bzw. 80 % Verlust des  $\Delta\psi_m$  bei der höchsten Vincristinkonzentration von 5 nM (s. Abb. 6A). In Kombination mit GSK-J4 wird dieser Effekt jedoch um ca. 10 % abgeschwächt (s. Abb. 5C, Abb. 6C).



*Abb. 5: Zelltod in CCRF-CEM-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit A) Vincristin, B) dem KDM6B-Inhibitor GSK-J4, C) Kombinationsbehandlung von GSK-J4 und Vincristin*

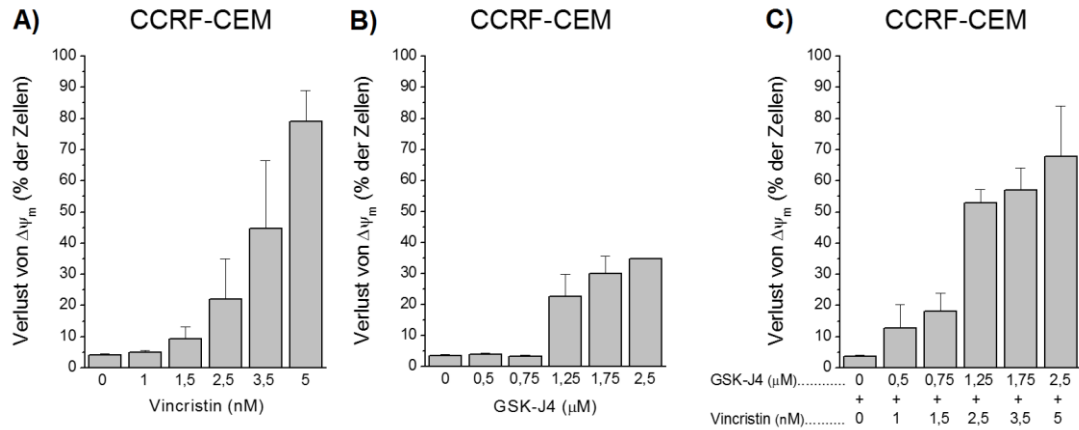


Abb. 6: Verlust des  $\Delta\psi_m$  in CCRF-CEM-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit A) Vincristin, B) dem KDM6B-Inhibitor GSK-J4, C) Kombinationsbehandlung von GSK-J4 und Vincristin

Auch die Überprüfung mittels Kombinationsindex nach Chou-Talalay zeigt Werte über 1, die in allen Kombinationsreihen für einen deutlichen Antagonismus der Substanzen sprechen (s. Tabelle 3).

GSK-J4 ( $\mu$ M)	Vincristin (nM)	CI-Wert
0,5	1	1,628
0,75	1,5	1,424
1,25	2,5	1,143
1,75	3,5	1,423
2,5	5	1,816

Tabelle 3: Chou-Talalay-Kombinationsindex (CI-Wert) für Kombinationsbehandlung von GSK-J4 mit Vincristin bei CCRF-CEM-Zellen. Bedeutung des Kombinationsindex:  $CI > 1$  Antagonismus,  $CI < 1$  Synergismus,  $CI = 1$  rein additiver Effekt

## 5.4 Experimente an Jurkat-Zellen

Für die Jurkat-Zellen ergaben sich in verschiedenen Vorversuchen dieselben Konzentrationsreihen wie für die CCRF-CEM-Zellen. Sie wurden genauso für 72 h mit Dexamethason (0; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7; 1  $\mu$ M), Vincristin (0; 1; 1,5; 2,5; 3,5; 5 nM), GSK-J4 (0; 0,5; 0,75; 1,25; 1,75; 2,5  $\mu$ M), sowie der Kombination des KDM6B-Inhibitors GSK-J4 jeweils mit Dexamethason bzw. Vincristin behandelt. Zelltod und Verlust des  $\Delta\psi_m$  wurden jeweils per Durchflusszytometrie analysiert.

#### 5.4.1 Kombinationsbehandlung: GSK-J4 mit Dexamethason

Ähnlich den CCRF-CEM-Zellen, kam es auch bei Jurkat-Zellen zu keinem bemerkenswerten Effekt der Dexamethasonbehandlung (s. Abb. 7A, Abb. 8A). Die GSK-J4-Behandlung dagegen führte zu einem beachtlichen Resultat beider Parameter. Die FACS-Analyse ergab bis zu 43 % tote Zellen (s. Abb. 7B) und 92 % Zellen ohne  $\Delta\psi_m$  (s. Abb. 8B). Die Kombination von GSK-J4 und Dexamethason brachte jedoch kaum Veränderungen zur GSK-J4-Einzelbehandlung (s. Abb. 7C, Abb. 8C).

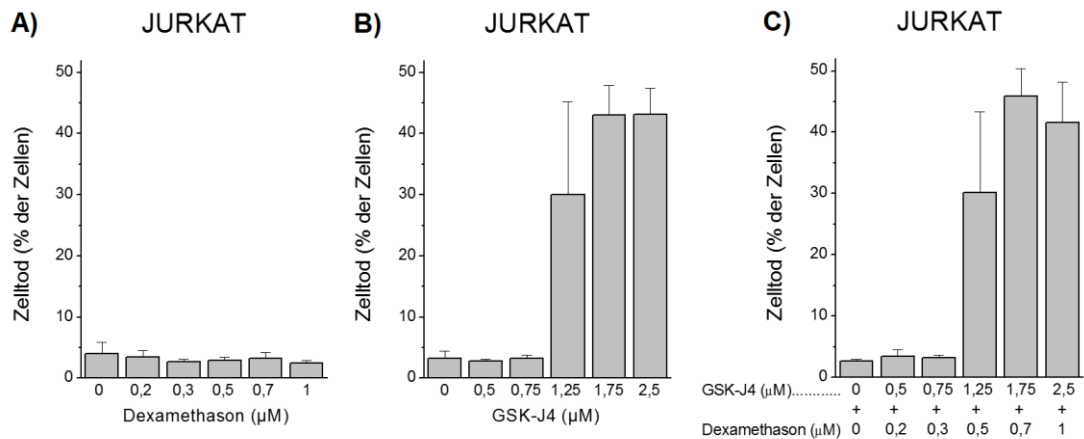


Abb. 7: Zelltod in Jurkat-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit A) Dexamethason, B) dem KDM6B-Inhibitor GSK-J4, C) Kombinationsbehandlung von GSK-J4 und Dexamethason

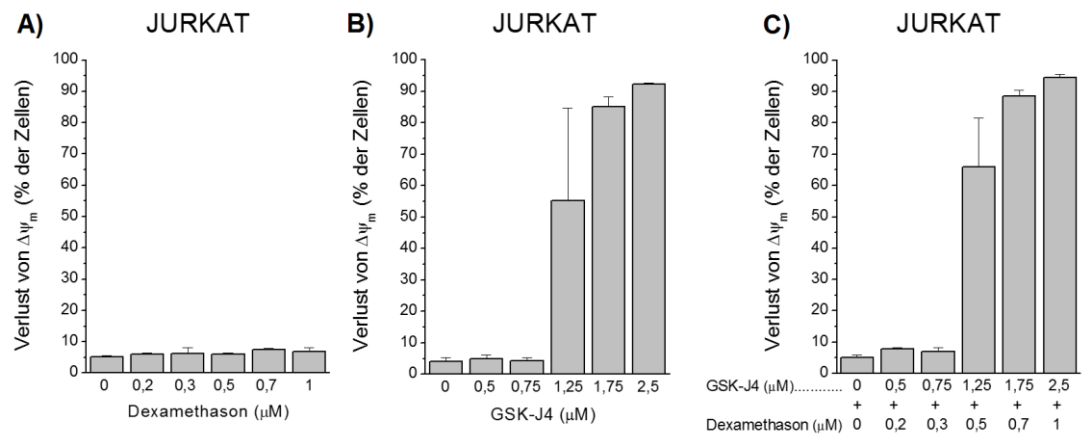


Abb. 8: Verlust des  $\Delta\psi_m$  in Jurkat-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit A) Dexamethason, B) dem KDM6B-Inhibitor GSK-J4, C) Kombinationsbehandlung von GSK-J4 und Dexamethason

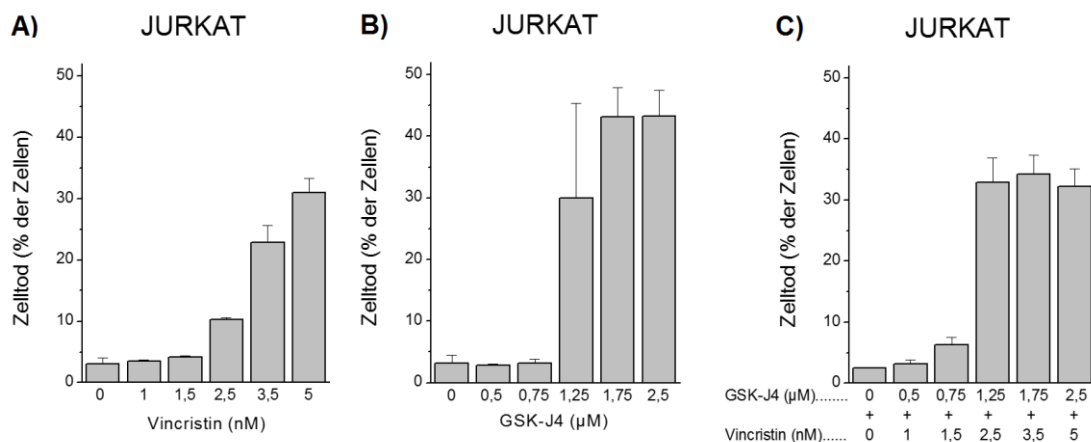
Die CI-Werte stiegen hier drastisch über 1, was für einen starken Antagonismus beider Zytostatika bei Jurkat-Zellen spricht (s. Tabelle 4).

GSK-J4 ( $\mu\text{M}$ )	Dexamethason ( $\mu\text{M}$ )	CI-Wert
0,5	1	2,678
0,75	1,5	2,86
1,25	2,5	4,44E+10
1,75	3,5	2,99E+13
2,5	5	8,59E+12

*Tabelle 4: Chou-Talalay-Kombinationsindex (CI-Wert) für Kombinationsbehandlung von GSK-J4 mit Dexamethason bei Jurkat-Zellen. Bedeutung des Kombinationsindex:  $CI > 1$  Antagonismus,  $CI < 1$  Synergismus,  $CI = 1$  rein additiver Effekt*

#### 5.4.2 Kombinationsbehandlung: GSK-J4 mit Vincristin

Die Jurkat-Zellen reagierten ähnlich wie CCRF-CEM-Zellen auf die Behandlung mit Vincristin mit einem Zelltod von bis zu 31 % der Zellen (s. Abb. 9A) und einem Verlust des  $\Delta\psi_m$  von bis zu 88 % der Zellen (s. Abb. 10A). In Kombination mit GSK-J4 zeigte sich auch bei diesen Zellen eine deutliche Abschwächung des GSK-J4-Effekts vor allem bezüglich des Zelltods. Dieser sinkt von ca. 40 % toter Zellen bei GSK-J4-Behandlung auf ca. 30 % tote Zellen in der Kombination mit Vincristin (s. Abb. 9C). Die CI-Werte bestätigen diesen antagonistischen Effekt (s. Tabelle 5). Der Verlust des  $\Delta\psi_m$  während



*Abb. 9: Zelltod in Jurkat-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit A) Vincristin, B) dem KDM6B-Inhibitor GSK-J4, C) Kombinationsbehandlung von GSK-J4 und Vincristin*

der Kombinationsbehandlung zeigt hingegen kaum Schwankungen verglichen mit der GSK-J4-Monobehandlung (s. Abb. 10C).

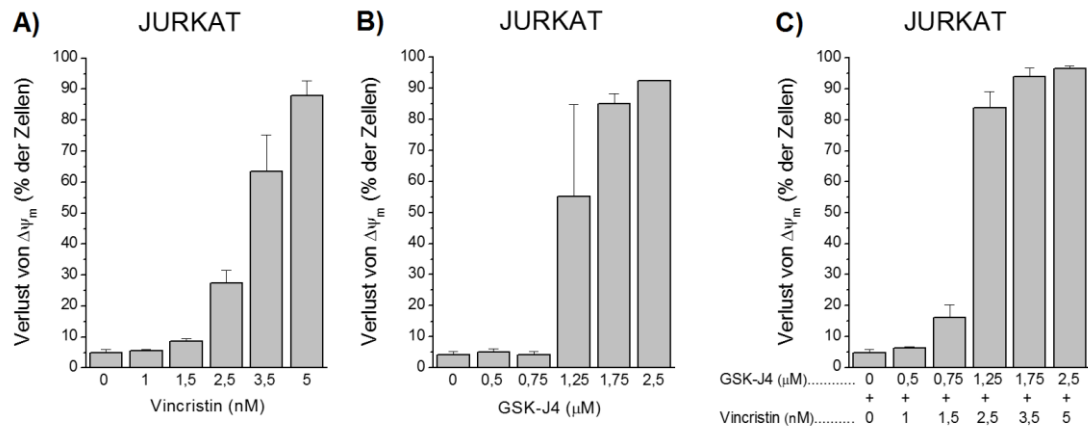


Abb. 10: Verlust von  $\Delta\psi_m$  in Jurkat-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit A) Vincristin, B) dem KDM6B-Inhibitor GSK-J4, C) Kombinationsbehandlung von GSK-J4 und Vincristin

Die Auswertung des Kombinationsindex nach Chou und Talalay spricht in allen Konzentrationsreihen für einen Antagonismus beider Substanzen (s. Tabelle 5).

GSK-J4 ( $\mu$ M)	Vincristin (nM)	CI-Wert
0,5	1	1,807
0,75	1,5	1,902
1,25	2,5	1,202
1,75	3,5	1,636
2,5	5	2,441

Tabelle 5: Chou-Talalay-Kombinationsindex (CI-Wert) für Kombinationsbehandlung von GSK-J4 mit Vincristin bei Jurkat-Zellen. Bedeutung des Kombinationsindex:  $CI > 1$  Antagonismus,  $CI < 1$  Synergismus,  $CI = 1$  rein additiver Effekt

## 5.5 z-VAD-fmk-Experimente

Zusätzlich zu den Zytostatika wurden beide Zelllinien mit dem Pan-Caspaseinhibitor z-VAD-fmk behandelt. Dies sollte Aufschluss über den Zelltodmechanismus geben, den GSK-J4 auslöst. Dazu wurden die Zellen jeweils eine Stunde vor GSK-J4-Applikation mit z-VAD-fmk behandelt. Die Durchflusszytometrie ergab bei CCRF-CEM-Zellen einen geringen jedoch signifikanten Rückgang des Zelltods um ca. 5 % ( $P=0,015$ ) und bei Jurkat-Zellen sogar um 23 % ( $P=0,0011$ ) unter z-VAD-fmk-Vorbehandlung (s. Abb. 11). Die Analyse des Verlusts des  $\Delta\psi_m$  zeigte bei CCRF-CEM-Zellen keinen Unterschied. Bei den Jurkat-Zellen ging der Verlust des  $\Delta\psi_m$  unter z-VAD-fmk-Vorbehandlung signifikant um ca. 60 % zurück ( $P=0,0011$ , s. Abb. 12).

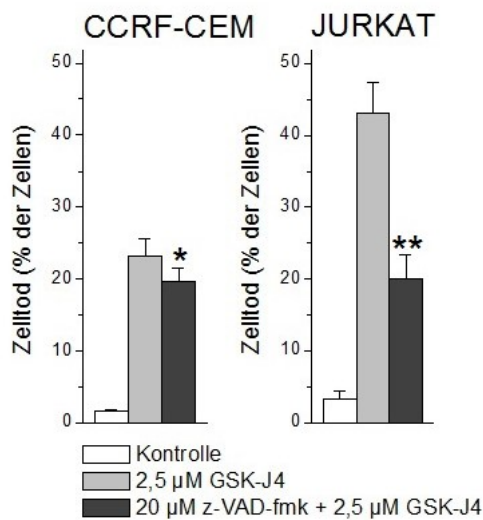


Abb. 11: Verlust des Zelltods bei CCRF-CEM- und Jurkat-Zellen je mit GSK-J4-Monobehandlung (grau) und z-VAD-fmk-Vorbehandlung + GSK-J4 (schwarz). Kontrolle wurde mit DMSO behandelt (weiß). \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$

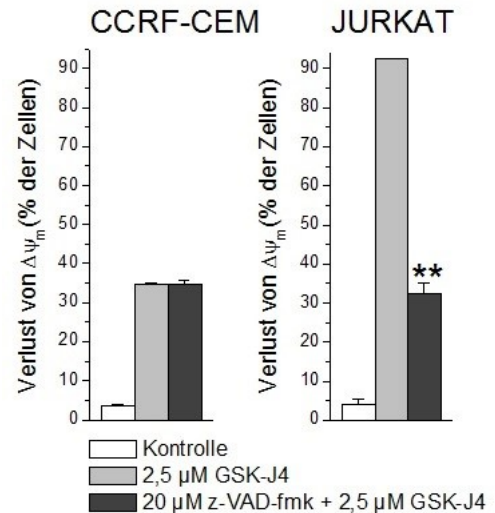


Abb. 12: Verlust des  $\Delta\psi_m$  bei CCRF-CEM- und Jurkat-Zellen je mit GSK-J4-Monobehandlung (grau) und z-VAD-fmk-Vorbehandlung + GSK-J4 (schwarz). Kontrolle wurde mit DMSO behandelt (weiß). \*\* $p<0,01$



## 6 Diskussion

Durch die kürzliche Entdeckung der KDMs trat eine neue Enzymgruppe in den Mittelpunkt der epigenetischen Forschung. Verschiedene Studien zeigten, dass KDMs sowohl als Transkriptionsaktivatoren als auch als -suppressoren wirken können und dadurch maßgeblich an der Entstehung von Krankheiten, insbesondere Tumorerkrankungen, beteiligt sind. Dabei zeigten sich vor allem die zehn ausgewählten KDMs KDM1A, -2B, -3B, -4A, -4B, -4C, -5A, -5B, -6A und -6B als vielversprechende Forschungsansätze in der Kanzerogenese. (Cloos et al. 2006, Ehrbrecht et al. 2006, He et al. 2011, Hojfeldt et al. 2013, Hu et al. 2001, Ntziachristos et al. 2014, Shen et al. 2012, van Haaften et al. 2009, Wada et al. 2015, Yang et al. 2000)

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Expressionsanalyse der zehn KDM-Isoformen bei Patienten mit kindlicher ALL und gesunden Knochenmarkspendern. Anschließend wurde nach Zusammenhängen zwischen Expressionslevel und klinischen Prognoseparametern bei pädiatrischen ALL-Patienten gesucht. Des Weiteren wurde eine mögliche Sensibilisierung für die bereits langjährig eingesetzten Standardarzneimittel Dexamethason und Vincristin durch eine Kombinationsbehandlung mit dem spezifischen KDM6B-Inhibitor GSK-J4 untersucht. Hierfür wurden jeweils Mono- und Kombinationsbehandlungsexperimente an den pädiatrischen ALL-Zelllinien CCRF-CEM und Jurkat durchgeführt. Durch Vorbehandlung mit dem Pan-Caspaseinhibitor z-VAD-fmk sollte der durch GSK-J4 ausgelöste Zelltodmechanismus näher charakterisiert werden.

### 6.1 Expressionsanalyse der KDMs & Korrelation mit klinischen Prognoseparametern

In dieser Arbeit wurde das Expressionsmuster von zehn ausgewählten KDM-Isoenzymen bei kindlicher ALL bestimmt. Dazu wurden die KDM-Expressionslevel der kindlichen ALL-Proben mit denen der Proben von gesunden Knochenmarkspendern verglichen. Die KDM-Expressionslevel der ALL-Patientenproben wurden mit bedeutsamen klinisch-pathologischen Parametern verknüpft.

### **KDM1A**

Hier zeigte sich eine hohe Expression von KDM1A bei den ALL-Patienten im Verhältnis zu den Knochenmarkspendern. Für KDM1A wurde bereits eine Assoziation von Überexpression und leukämischer Transformation bei hämatopoetischen Stammzellen in anderen Studien beschrieben, nämlich, dass KDM1A vor allem in Leukämiezelllinien mit den ungünstigen Parametern BCR-ABL-Translokation und T-Zell-Phänotyp stark exprimiert wurde. (Wada et al. 2015, Li et al. 2012) Vor diesem Hintergrund entsprach die hohe KDM1A-Expression in kindlichen ALL-Zellen, welche die vorliegenden Analysen ergeben haben, den Erwartungen. Des Weiteren zeigte die KDM1A-Expression eine signifikante Korrelation mit den ungünstigen klinisch-pathologischen Parametern Alter unter einem oder über neun Jahren, schlechtes Ansprechen auf Prednison und initial hohe Leukozytenzahl. Außerdem konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der hohen KDM1A-Expression und einem schlechten Therapieergebnis im Sinne von Rezidiv, Knochenmarktransplantation oder Tod aufgezeigt werden. Dies stimmt mit Forschungsergebnissen von Wu et al. (2015) überein, die bereits von einem schlechten Überleben bei KDM1A-Überexpression bei Tumorpatienten berichteten. Diese Ergebnisse lassen KDM1A als vielversprechenden Angriffspunkt für zukünftige epigenetische Therapiestrategien vermuten.

Insgesamt ist KDM1A die bisher am besten untersuchte KDM. Aktuell finden die spezifischen KDM1A-Inhibitoren ORY1001 und GSK2879552 bereits Anwendung in klinischen Phase I Studien bei akuter Leukämie und dem kleinzelligen Bronchialkarzinom. (Maiques-Diaz und Somervaille 2016, Mohammad et al. 2015)

### **KDM2B**

Die Untersuchungen von KDM2B zeigten einen Trend zur erhöhten Expression bei erkrankten Patienten sowie eine signifikant erhöhte Ausprägung bei Patienten unter einem bzw. über neun Jahren, mit schlechtem Ansprechen auf Prednison, mit T-ALL und initial hoher Leukozytenzahl. Diese Risikofaktoren sind mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf assoziiert. Bisher ist bekannt, dass KDM2B eine wichtige onkogene Rolle spielt und

beispielsweise die Entstehung von AML fördert, wobei der Pathomechanismus noch nicht hinreichend geklärt ist. (He et al. 2011, Kooistra und Helin 2012, Ueda et al. 2015) In Verbindung mit der Literatur lässt die hohe Expression bei kindlicher ALL in Zusammenhang mit den obengenannten Risikofaktoren vermuten, dass die KDM2B-Expression bei pädiatrischen ALL-Patienten auch als Prognoseparameter genutzt werden könnte und KDM2B möglicherweise ein neues therapeutisches Target darstellt. Dies sowie die Frage nach der Beteiligung von KDM2B an der Entstehung der ALL bedarf weiterer Forschung.

### ***KDM3B***

Für KDM3B wurde keine signifikante Expressionserhöhung bei Kindern mit ALL gefunden. Auch Hu et al. (2001) vermuteten, dass KDM3B eher eine Tumorsuppressorfunktion aufweist, da *KDM3B* auf einem Chromosomenabschnitt liegt, der oft bei AML und dem myelodysplastischen Syndrom deletiert ist. KDM3B scheint bei kindlicher ALL zwar noch vorhanden zu sein, unklar bleibt, ob eine Überexpression möglicherweise protektiv sein könnte.

### ***KDM4A, -4B, -4C***

Neben KDM1A war KDM4A das einzige Isoenzym, das bei ALL-Patienten signifikant höher exprimiert war als bei Gesunden. KDM4B und -4C zeigten keine höheren Expressionen. Eine Überexpression wurde für alle drei Isoformen bereits bei vielen verschiedenen Tumorarten beschrieben. (Cloos et al. 2006, Patani et al. 2011, Yang et al. 2000, Liu et al. 2009, Ehrbrecht et al. 2006) Bei kindlicher ALL scheint jedoch nur KDM4A überexprimiert zu sein, KDM4B und -4C zeigten keine aberranten Expressionsergebnisse. In einer Studie wurden bereits die Auswirkungen von KDM4A, -4B und -4C auf das Zellwachstum myeloischer Vorläuferzellen untersucht. Es konnte eine leukämische Transformation beobachtet werden. Außerdem konnte durch kombinierte dreifach *Knockouts* von *KDM4A*, *-4B* und *-4C in vivo* eine signifikante Wachstumsverminderung der Zellen bei muriner AML demonstriert werden. (Agger et al. 2016) Da bisher keine selektiven Inhibitoren für die KDM4-Isoformen verfügbar sind, bleibt abzuwarten, wie sich eine mögliche Hemmung auf die Krankheitsentwicklung und -dauer auswirkt.

(Wang et al. 2013, Bavetsias et al. 2016) Interessant wäre dieser Ansatz auch bei der kindlichen ALL, da die KDM4A-Überexpression zusätzlich mit dem Risikofaktor Alter unter einem bzw. über neun Jahren signifikant korrelierte.

### **KDM5A**

Die Expressionsanalysen der vorliegenden Arbeit ergaben keine signifikante Überexpression von KDM5A bei ALL-Patienten. Dafür zeigte sich ein Zusammenhang zwischen hohen Expressionsniveaus und Patienten mit einem Alter unter einem bzw. über neun Jahren sowie Patienten mit einer initial hohen Leukozytenzahl. In anderen Arbeiten wurde das Fusionsgen *NUP98-KDM5A* bei AML entdeckt, welches jedoch nicht mit Risikofaktoren assoziiert war. (van Zutven et al. 2006, de Rooij et al. 2013) Es induzierte Leukämie im Mausmodell. (Wang et al. 2009a) Zu Expressionsergebnissen bei Leukämie liegen bereits Erkenntnisse bei der CML vor. Hier konnte gezeigt werden, dass KDM5A die leukämische Zelldifferenzierung stimuliert und gleichzeitig die Zellproliferation hemmt. Außerdem wurde abhängig vom Krankheitsstadium ein verändertes Expressionsmuster von KDM5A entdeckt. In späten Stadien der CML war die KDM5A unterexprimiert im Vergleich zu frühen Stadien. Dies ließ Schlussfolgerungen zu, dass die Unterexpression sowohl Pathogenese als auch Progression der CML fördert. (Zhou et al. 2015) Da in der vorliegenden Arbeit keine Daten zum Krankheitsstadium der Patienten vorliegen, kann bezüglich Veränderungen im Expressionsmuster bei KDM5A leider keine Aussage bei kindlicher ALL getroffen werden, was Anlass zu weiterer Forschung gibt. Da eine hohe KDM5A-Expression signifikant mit zwei wichtigen Risikofaktoren korrelierte, wäre es durchaus denkbar, dass sich das Expressionsausmaß von KDM5A mit dem Krankheitsverlauf verändert.

### **KDM5B**

KDM5B verhielt sich bei der Expressionsanalyse ähnlich wie KDM5A. Es konnte zusätzlich noch ein Zusammenhang zwischen hoher KDM5B-Ausprägung und schlechtem Prednisonansprechen bei den ALL-Patienten gefunden werden. Bisher fand man bei vielen verschiedenen Tumorerkrankungen eine KDM5B-Überexpression, dazu zählen u. a. das Mamma-CA (Barrett et al. 2002), das Melanom (Roesch et al. 2010), das Prostata-CA

(Xiang et al. 2007b), das Blasen-CA (Hayami et al. 2010), aber auch das DLBCL (Liggins et al. 2010), verschiedene leukämische Zelllinien (Su et al. 2015) und viele Leukämiearten. Vor allem bei B-ALL fand man stark erhöhte Expressionslevel von KDM5B, die durch verschiedene enzymatische Regulationen beeinflusst wurden, u. a. von der Aktivität von HDAC1. (Wang et al. 2016) In der vorliegenden Arbeit konnte für die kindliche ALL nur ein Trend zur Überexpression von KDM5B gezeigt werden. Die Assoziierung der KDM5B-Überexpression mit drei wichtigen Risikofaktoren lässt jedoch Schlüsse zu, dass KDM5B möglicherweise bei Hochrisikopatienten hochreguliert wird.

### **KDM6A**

Die Untersuchungen von KDM6A zeigten einen Trend zur Überexpression bei Kindern mit ALL im Vergleich zu gesunden Knochenmarkspendern. KDM6A war die einzige KDM die eine signifikant erhöhte Ausprägung bei Jungen zeigte. Diese erhöhte Ausprägung von KDM6A beim männlichen Geschlecht war zu erwarten, da dies besonders für T-ALL bereits bekannt ist. Eine Studie konnte bereits eine somatische *loss-of-function*-Mutation von KDM6A bei männlichen T-ALL-Patienten nachweisen und so die Rolle von KDM6A als Tumorsuppressor auch bei pädiatrischen ALL-Patienten festigen. (Van der Meulen et al. 2015) Bis dato war die Tumorsuppressorfunktion von KDM6A bekannt beim multiplen Myelom, dem Ösophagus-CA und dem Nieren-CA. (van Haaften et al. 2009) Interessanterweise befindet sich diese *loss-of-function*-Mutation von KDM6A auf dem X-Chromosom, was die Präferenz von T-ALL in männlichen Patienten erklären könnte. Weiblichen Patienten können durch das zweite X-Chromosom weiterhin KDM6A synthetisieren und dessen tumorsuppressive Funktion aufrechterhalten. (Van der Meulen et al. 2015)

### **KDM6B**

KDM6B kommt in dieser Arbeit besondere Aufmerksamkeit zu, da sich in den Expressionsanalysen die bedeutendsten Ergebnisse zeigten.

KDM6B war die einzige KDM, die bei gesunden Knochenmarkspendern signifikant höher exprimiert war als bei kindlichen ALL-Patienten. Diese verminderte Expression war bisher bekannt für Nierenzell-CA, Lungen-CA,

Leber-CA und einigen hämatopoetischen Tumorerkrankungen. (Agger et al. 2009, Hong et al. 2017)

Die Ergebnisse bezüglich Erkrankungen lymphatischen Ursprungs sind heterogen. Gravierend niedrige KDM6B-Ausprägungen fanden sich bei einigen Lymphomen, z. B. dem DLBCL, aber auch Leukämiearten. (Agger et al. 2009) Eine neue Studie zeigte andererseits eine Überexpression von KDM6B beim DLBCL, v. a. beim keimzentrumsartigen Typ. (Mathur et al. 2017) Weitere Überexpression von KDM6B bei lymphatischen Krankheiten wurden u. a. beschrieben bei der chronisch lymphathischen B-Zell-Leukämie (Agger et al. 2009) und der T-ALL (Dik et al. 2005, Ntziachristos et al. 2014). Für die T-ALL wurde KDM6B überdies eine onkogene Rolle zugesprochen, die in Auslösung und Aufrechterhaltung der Leukämie resultiert. (Ntziachristos et al. 2014)

Eine mögliche Erklärung für die Abweichung der Expressionsniveaus bei Gesunden und Kranken zwischen diesen Studien und der vorliegenden Arbeit könnte die Heterogenität in Patientenalter und Kohortengröße sein. In der vorliegenden Arbeit wurden 88 an ALL erkrankte Kinder mit verhältnismäßig wenig gesunden adulten Knochenmarkspendern verglichen. Vergleichsweise wurden in der Studie von Mathur et al. (2017) insgesamt 414 Lymphom-Patienten ohne Altersangaben analysiert. Da Lymphome bevorzugt bei Erwachsenen auftreten, lässt sich vermuten, dass in der Studie von Mathur et al. (2017) adulte Patienten untersucht wurden, wodurch sich ebenfalls abweichende Expressionsergebnisse erklären ließen.

Auch bei anderen Tumorerkrankungen wurden KDM6B-Überexpressionen gefunden. Hier sind u. a. das Prostata-CA (Xiang et al. 2007a), das Pleuramesotheliom (Cregan et al. 2017), das Bronchial-CA (Burchfield et al. 2015) und das multiple Myelom (Ohguchi et al. 2017) zu nennen.

Trotz der verhältnismäßig geringeren Expression von KDM6B bei pädiatrischen ALL-Patienten zeigte sich ein Zusammenhang zwischen hoher KDM6B-Ausprägung und den Risikofaktoren Alter unter einem bzw. über neun Jahren, schlechtem Prednisonansprechen, T-ALL-Phänotyp sowie schlechtem Therapieergebnis im Sinne eines Rezidivs, einer Knochenmarktransplantation oder dem Tod. Demgemäß konnte kürzlich eine

Korrelation von hohen KDM6B-Expressionslevel mit niedrigen Überlebensraten beim DLBCL dargestellt werden. (Mathur et al. 2017)

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass KDM6B zwar bei Kindern mit ALL niedriger ausgeprägt ist als bei Gesunden, aber wenn KDM6B höher exprimiert ist, geht dies mit einer schlechten Prognose einher. Ob sich KDM6B als Verlaufsmarker bei lymphatischen Erkrankungen erweist, bedarf noch weiterer krankheitsspezifischer Forschung mit größeren Fallzahlen.

## **6.2 Kombinationsbehandlungen: GSK-J4 mit Standardtherapeutika**

Im Verlauf dieser Arbeit wurden Einzel- und Kombinationsbehandlungen an zwei verschiedenen Zelllinien mit dem KDM6B-Inhibitor GSK-J4 sowie den klinisch verwendeten Standardtherapeutika Dexamethason und Vincristin durchgeführt.

### **6.2.1 Dexamethason-Sensibilisierung durch GSK-J4**

Die Dexamethason-Monotherapie führte weder bei CCRF-CEM- noch bei Jurkat-Zellen zu einem erwähnenswerten Anstieg des Zelltods bzw. des Verlusts des  $\Delta\psi_m$ . Bei CCRF-CEM-Zellen sind Dexamethason-resistente und -sensitive Subtypen bekannt. (Medh et al. 2003, Norman und Thompson 1977) Bei der hier verwendeten CCRF-CEM-Zelllinie handelt es sich um die Dexamethason-resistente Ursprungslinie. Die zweite verwendete T-Zelllinie Jurkat ist ebenso bekannt für ihre Resistenz gegen Dexamethason, sodass auch hier das Nicht-Ansprechen gegenüber der Dexamethasonmonotherapie zu erwarten waren. (Beesley et al. 2006) Als Ursache für diese Resistenz gegenüber Dexamethason wird beschrieben, dass in einer Zelllinie sowohl Dexamethason-resistente als auch -sensible Zellen vorliegen. Mit der zunehmenden Zeit nach der Isolation der Zelllinien wäre es möglich, dass Dexamethason-sensible Zellen spontan zu resistenten Zellen konvertieren und sich anhäufen. (Norman und Thompson 1977) Neuere Studien vermuten außerdem einen Defekt im Glukokortikoidrezeptor, wodurch es zu einer gestörten Ligand-Rezeptor-Interaktion und somit zur Dexamethasonresistenz kommt. (Bhadri et al. 2012, Beesley et al. 2009)

Bei der Kombinationstherapie von Dexamethason und GSK-J4 zeigten sich verschiedene Resultate bei den Zelllinien. Die CCRF-CEM-Zellen weisen bei dualer Behandlung eine deutliche Zunahme des Zelltods und des Verlusts des  $\Delta\psi_m$  im Vergleich zur Einzelbehandlung auf. Demnach scheint GSK-J4 eine Sensibilisierung für Dexamethason in CCRF-CEM-Zellen zu induzieren.

Beim DLBCL konnte bereits eine solche Sensibilisierung für die eingesetzten Standardmedikamente Vincristin, Doxorubicin, Bortezomib, Carfilzomib, Vorinostat und Panobinostat durch GSK-J4-Behandlung gezeigt werden. Woraufhin geschlossen wurde, dass GSK-J4 geeignet sein könnte, DLBCL für die übliche Chemotherapie zu sensibilisieren. Diese Chemotherapie besteht aus einer Kombination von Rituximab, Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin und Prednison. (Mathur et al. 2017) Auch beim kastrationsresistenten Prostata-CA konnte ein Synergismus zwischen GSK-J4 und dem hier oft verwendeten Chemotherapeutikum Cabazitaxel in niedrigen Dosen nachgewiesen werden. (Morozov et al. 2017) Die Wirkung von Dexamethason in Kombination mit GSK-J4 wurde in beiden Studien nicht untersucht. Dennoch lassen diese Resultate zusammen mit den vorliegenden Ergebnissen mutmaßen, dass GSK-J4 synergistisch mit anderen Chemotherapeutika wirkt und sowohl DLBCL-Zellen als auch T-ALL-Zellen für Dexamethason bzw. Prednison sensibilisieren kann und somit einen zukunftssträchtigen Therapieansatz darstellen könnte.

Die GSK-J4-Therapie bei Jurkat-Zellen zeigte im Vergleich zu den CCRF-CEM-Zellen einen prozentual höheren Anteil von Zelltod und Verlust des  $\Delta\psi_m$ , dieser blieb jedoch in Kombination mit Dexamethason nahezu unverändert. Der Anteil an toten Zellen sank sogar etwas bei dualer Dexamethason-GSK-J4-Behandlung, sodass sich hier tatsächlich ein Antagonismus der beiden Substanzen ergab.

Diese verschiedenen Ergebnisse der beiden T-ALL-Zelllinien CCRF-CEM und Jurkat sind schwer zu erklären. Die beiden Zelllinien unterschieden sich in Alter und Geschlecht der Ursprungspatienten, sowie dem Zeitpunkt der Zelllinienetablierung. Jurkat wurde aus der Leukämie eines 14-jährigen Jungen im ersten Rezidiv generiert, während CCRF-CEM auf die Leukämie eines dreijährigen Mädchens im terminalen Rezidiv zurückgeht. (Foley et al.



1965, Schneider et al. 1977) Somit zählt der Jurkat-Ursprungspatient zur Risikogruppe bezüglich Alter (unter einem bzw. über neun Jahre). Möglicherweise hat Jurkat im Sinne einer Hochrisiko-Zelllinie nicht vorteilhaft auf die Kombinationstherapie reagiert.

Möglich wäre zusätzlich, dass sich das Expressionsmuster von KDM6B mit dem ALL-Krankheitsverlauf verändert, wie es bei CML für die KDM5A-Expression bekannt ist. Bei der CML kamen hohe KDM5A-Ausprägungen vor allem in frühen Stadien vor, die mit zunehmendem Krankheitsverlauf abnahmen. (Zhou et al. 2015) Hypothetisch könnten die CCRF-CEM-Zellen durch den fortgeschrittenen Krankheitsverlauf KDM6B aberrant exprimiert haben oder sich anderweitig verändert haben, sodass sie im Vergleich zu Jurkat-Zellen empfindlicher auf die verwendeten Medikamente reagieren, und daher einen höheren Anteil toter Zellen aufweisen.

Allerdings waren die KDM6B-Expressionslevel von CCRF-CEM und Jurkat trotz der unterschiedlichen Krankheitsstadien, anderen Geschlechts und Alters nahezu identisch. Somit scheint eine aberrante KDM6B-Expression, und infolge dessen eine abweichende GSK-J4-Effektivität, als Ursache für die unterschiedlichen Behandlungsergebnisse unwahrscheinlich.

Ähnliche Resultate fanden Morozov et al. beim Untersuchen der GSK-J4-Cabazitaxel-Kombinationstherapie bei Prostata-CA-Zelllinien. Auch hier exprimierten alle Zelllinien KDM6B in vergleichbarem Ausmaß. Dennoch reagierte eine der getesteten Prostata-CA-Zelllinien schwächer auf GSK-J4 alleine und antagonistisch auf GSK-J4-Cabazitaxel-Kombinationsbehandlung. Die kastrationsresistenten Prostata-CA-Zelllinien zeigten hingegen eine synergistische Reaktion auf die kombinierte Behandlung. (Morozov et al. 2017)

Da auch in der vorliegenden Arbeit trotz gleicher KDM6B-Expressionslevel und Dexamethasonresistenz verschiedene Therapieergebnisse vorliegen, scheint es nicht ungewöhnlich, dass Zelllinien derselben Krankheit verschieden reagieren. Ein weiterer denkbarer Erklärungsansatz könnten immunologische Unterschiede sein. Zwar sind sowohl Jurkat als auch CCRF-CEM T-ALL-Zelllinien, jedoch besitzen sie laut Analyse der DSMZ unterschiedliche immunophänotypische CD-Oberflächenproteine (engl. *cluster of differentiation*, CD), die für die differenten Therapieergebnisse

mitverantwortlich sein könnten (DSMZa 2017, DSMZb 2017). Mutmaßlich könnte GSK-J4 in Kombination mit Dexamethason mit einigen dieser Oberflächenproteine der Jurkat-Zellen interagieren. Diese Interaktion könnte dazu führen, dass GSK-J4 unwirksam wird oder dass andere wichtige Signalwege beeinflusst werden, die den Zelltod antagonisieren.

Ob wirklich eine Bindung von GSK-J4 und Jurkat-eigenen CD-Molekülen stattfindet und wenn ja, wie diese sich auf den Effekt von GSK-J4 auswirkt, lässt viel Raum für weitergehende Forschungen. Ferner sollte die Hypothese der veränderlichen KDM-Expression in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium überprüft werden.

Ein weiteres Argument für die verschiedenen Ergebnisse der Kombinationsbehandlung könnten Mutationen jeglicher Art sein. Für die KDMs sind gemäß des GSK-J4-Angriffspunkts drei Enzyme bekannt: Vorrangig KDM6B, aber auch KDM6A und in geringem Maß die KDM5-Subfamilie. (Kruidenier et al. 2012, Heinemann et al. 2014) Bezüglich dieser Auswahl an KDMs ist für KDM6A eine besondere Mutation bekannt. Die *KDM6A-loss-of-function*-Mutation findet sich ausschließlich bei Jungen mit T-ALL. (Van der Meulen et al. 2015)

Übertragend auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnte dies folgendes bedeuten: Da Jurkat auf einen 14-jährigen Jungen mit T-ALL zurückgeht, könnte möglicherweise auch in Jurkat die *loss-of-function*-Mutation von KDM6A vorliegen. Der Methylierungsstatus im Genom ist dynamisch reguliert, sodass es bei einer *KDM6A-loss-of-function*-Mutation möglich wäre, dass eine weitere Inhibition der KDM6B durch GSK-J4 gar nicht mehr möglich ist und es infolge dessen zum Antagonismus mit Dexamethason bei Jurkat-Zellen kommt. Dies könnte zum einen aufgrund des Methylierungsgleichgewichts, was möglichst aufrechterhalten werden soll, passieren. Zum anderen durch Prozesse, die sich der Mutation anschließen, wie z. B. die Unterdrückung von verschiedenen Tumorsuppressorgenen aufgrund des veränderten Methylierungsstatus. (van Haaften et al. 2009, Van der Meulen et al. 2015) Bisher liegen keine Daten zu einer KDM6A-Mutation in Jurkat-Zellen vor, sodass auch diese Hypothese noch genauer erörtert werden sollte.

Auf jeden Fall zeigen diese Daten, dass GSK-J4 zwar in einigen Fällen zur Glukokortikoid-Sensibilisierung dienen könnte, aber nicht grundsätzlich von

einer derartigen Wirkung ausgegangen werden kann. Im klinischen Einsatz müsste mithin mit Hilfe personalisierter Medizin individuell geklärt werden, ob der Patient von der GSK-J4-Behandlung profitieren könnte.

### **6.2.2 Antagonismus zwischen GSK-J4 und Vincristin**

Neben der Wirkung von Dexamethason wurde auch der Effekt von Vincristin auf CCRF-CEM- und Jurkat-Zellen in der vorliegenden Arbeit untersucht. Beide T-ALL-Zelllinien zeigten unter Vincristinbehandlung einen deutlich stärkeren Anteil an toten Zellen und Verlust des  $\Delta\psi_m$  als unter GSK-J4-Behandlung. Beide Zelllinien sind dafür bekannt, sensibel für Vincristin zu sein. (Beesley et al. 2006) Bei Kombination von GSK-J4 und Vincristin ergab sich ein anteiliger Rückgang der toten Zellen und der Zellen ohne  $\Delta\psi_m$  im Vergleich zur Vincristin-Einzelbehandlung. Die Bestimmung der CI-Werte demonstrierte einen deutlichen Antagonismus der beiden Therapeutika, in Jurkat-Zellen etwas stärker als in CCRF-CEM-Zellen. Ein solcher Antagonismus wurde bislang noch nicht beschrieben.

Wenn man bedenkt, an welcher Stelle die beiden Pharmaka im Zellzyklus angreifen, könnte man mutmaßen, dass sie sich eventuell gegenseitig blockieren. GSK-J4 führte bei ALL-Zellen zum Zellzyklusarrest. Dabei verbleibt etwas weniger als die Hälfte der Zellen jeweils in der G0- bzw. G1-Phase und in der S-Phase des Zellzyklus. Nur bei 3 % der Zellen führt GSK-J4 zum Verbleiben in der G2- oder Mitosephase. (Ntziachristos et al. 2014) Vincristin kann nur in der Mitosephase angreifen, indem es die Ausbildung des Spindelapparats hemmt. Wenn sich aber durch GSK-J4 nur 3 % aller Zellen in der Mitose befinden, kann Vincristin die Wirkung von GSK-J4 vermutlich nicht entscheidend vorteilhaft beeinflussen. Womöglich überwiegen dann unvorteilhafte Nebeneffekte des Alkaloids und fördern eine antagonistische Wirkung im Zusammenspiel mit GSK-J4.

Dem widersprüchlich liegt eine Studie vor, die einen Synergismus zwischen GSK-J4 und Vincristin bei DLBCL-Zellen darstellen konnte. Aufgrund dieses Synergismus wurde angenommen, dass GSK-J4 die DLBCL-Zellen für die übliche Chemotherapie sensibilisiert, die aus einer Kombination von Rituximab, Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin und Prednison besteht. (Mathur et al. 2017) Die unterschiedlichen Ergebnisse zu dieser

Studie könnten durch die Krankheit an sich zustande kommen. DLBCL und ALL sind zwar beide Erkrankungen des lymphatischen Systems, stellen aber dennoch zwei eigenständige Krankheiten mit unterschiedlichen Charakteristika dar.

Zusammengenommen deuten diese unterschiedlichen Befunde darauf hin, dass bei der Kombination von GSK-J4 und Vincristin eine gewisse Vorsicht geboten ist, um Patienten nicht womöglich mehr zu schaden als zu nutzen.

### **6.3 Induktion des apoptotischen Signalwegs durch GSK-J4**

Um Hinweise auf den von GSK-J4 ausgelösten Zelltodmechanismus zu bekommen, wurden CCRF-CEM- und Jurkat-Zellen jeweils mit dem Pan-Caspaseinhibitor z-VAD-fmk vorbehandelt. Hierbei zeigte sich ein deutlicher Rückgang von Zelltod und Verlust des  $\Delta\psi_m$ , vor allem bei Jurkat-Zellen. Nach z-VAD-fmk-Vorbehandlung starben zwar auch weniger CCRF-CEM-Zellen als ohne den Pan-Caspaseinhibitor, jedoch in geringerem Ausmaß als bei Jurkat-Zellen. Das  $\Delta\psi_m$  von CCRF-CEM-Zellen wurde durch z-VAD-fmk nicht beeinflusst.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Befunden. 2014 untersuchten Ntziachristos et al. den durch GSK-J4 verursachten Zelltod an verschiedenen T-ALL-Zelllinien, u. a. CCRF-CEM und Jurkat. Hier konnte bereits gezeigt werden, dass GSK-J4 in all diesen ALL-Zelllinien Apoptose induziert und zu Zellzyklusarrest führt. (Ntziachristos et al. 2014) Des Weiteren konnte Apoptose in DLBCL-Zellen unter GSK-J4-Behandlung nachgewiesen werden. (Mathur et al. 2017) Auch bei murinen differenzierten embryonalen Stammzellen führte die GSK-J4-Behandlung zu einem zwei- bis dreifachen Anstieg an apoptotischen Zellen und Zellzyklusarrest, vor allem in der G1-Phase. (Hofstetter et al. 2016)

In einer anderen Studie konnte GSK-J4 hingegen die durch Zytokine ausgelöste Apoptose in  $\beta$ -Zellen des Pankreas deutlich reduzieren. (Backe et al. 2017) Dies könnte durch die gänzlich verschiedene Abstammung, Morphologie und Funktion der Pankreaszellen im Vergleich zu ALL-Zellen erklärt werden.

Im Kontext mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lässt sich vermuten, dass Caspasen unter GSK-J4-Behandlung einen großen Anteil am Zelltod bei Jurkat-Zellen haben. Bei CCRF-CEM-Zellen scheinen Caspasen dagegen eher eine untergeordnete Rolle beim GSK-J4-induzierten Zelltod zu spielen. Möglicherweise verwendeten Ntziachristos et al. (2014) einen anderen CCRF-CEM-Klon, deren Zelltod vorrangig über Caspasen abläuft.

## 7 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten neue Erkenntnisse zur Bedeutung der KDMs in kindlicher ALL beitragen. Die zehn untersuchten KDMs, KDM1A, -2B, -3B, -4A, -4B, -4C, -5A, -5B, -6A und -6B, waren einerseits nicht generell bei den pädiatrischen ALL-Patienten höher exprimiert als bei gesunden Knochenmarkspendern. Andererseits war eine hohe Expression einiger KDMs, nämlich KDM1A, -2B, -5B und -6B mit ungünstigen Prognoseparametern assoziiert. Diese KDMs könnten sich als Screeningparameter für einen ungünstigen Verlauf bei jungen ALL-Patienten erweisen und Hinweise geben, eine andere, vielleicht aggressivere Therapie einzuleiten. Außerdem könnten diese vier KDMs, vor allem KDM6B, selbst einen neuen spezifischen Therapieansatz bilden.

Die hier durchgeführten Inhibitionsversuche von KDM6B lassen GSK-J4 als potenten Hemmstoff annehmen, der Apoptose und Zellzyklusarrest der Leukämiezellen initiieren kann. Zelltodanalysen mit dem Pan-Caspaseinhibitor z-VAD-fmk gaben Hinweise, die, untermauert durch Literatur, stark darauf hinweisen, dass GSK-J4 caspaseabhängig Apoptose in ALL-Zellen induziert. GSK-J4 könnte sich so als maßgebender Therapiebestandteil etablieren.

Kombinationsversuche zwischen GSK-J4 und Dexamethason zeigten widersprüchliche Ergebnisse. Dennoch könnten sie eine weitere Grundlage zur Etablierung neuer KDM6B-spezifischer Therapiestrategien darstellen und dabei helfen, KDM6B als neues Target zu etablieren. Somit sollte ein mutmaßlicher Synergismus der Substanzen bei Leukämiezellen noch weiter überprüft werden. Gleiches gilt für die Kombination des KDM6B-Inhibitors mit anderen Bestandteilen der aktuell verwendeten Chemotherapieprotokolle. Hier deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich Kombination von GSK-J4 und Vincristin auf kein vorteilhaftes Zusammenspiel dieser Substanzen hin. Grundsätzlich ist bei dualer Therapie von GSK-J4 mit Dexamethason oder Vincristin Vorsicht geboten, um Patienten nicht möglicherweise zu gefährden. Diese kombinatorischen Therapiestrategien mit GSK-J4 und konventionell verwendeten Chemotherapeutika müssen durch weiterführende Forschung ergänzend evaluiert werden.

Dieses Projekt konnte Hinweise geben, dass einige KDMs bei pädiatrischer ALL eine bedeutsame Rolle spielen. Weitergehende Fragen nach exakten Signalwegen, tumorfördernder Wirkung und zelltodspezifischen Rollen der KDMs bei der ALL-Pathogenese sind derzeit allerdings offen und lassen viel Raum für weitere Forschung.

Zukunftsorientierend könnten sich einige KDMs, v. a. KDM6B, als vielversprechende Prognoseparameter und neues Therapietarget etablieren. Da KDM6B ubiquitär vorkommt, scheint sie an vielfältigen Zellmechanismen beteiligt zu sein. Durch diese Komplexität ist es notwendig, die Funktion von KDM6B sowohl zell- als auch erkrankungsspezifisch zu evaluieren. Hierzu ist noch weitere Forschung nötig. Insbesondere Grundlagenforschung, die die exakte Wirkungsweise der KDMs, sowie die Konsequenzen und Regulierung der KDM-Wirkung im menschlichen Organismus tiefgehend eruiert, könnte aufschlussreiche Ergebnisse zu Tage bringen und helfen, die Komplexität dieser Enzyme zu verstehen. Erst wenn dies hinreichend geklärt ist, lassen sich KDM-bezogene Therapieoptionen in Erwägung ziehen.

## 8 Anhang

### 8.1 Tabelle 6: KDM-Expression in Korrelation mit ausgewählten klinisch-pathologischen Parametern

	KDM 1A			KDM 2B			KDM 3B			KDM 4A			KDM 4B		
	Median	Q1-Q3*	P-Wert	Median	Q1-Q3*	P-Wert	Median	Q1-Q3*	P-Wert	Median	Q1-Q3*	P-Wert	Median	Q1-Q3*	P-Wert
Alter															
1-9 Jahre (n=58, 65,9%)	2,30	1,82 - 2,52		2,14	1,39 - 2,94		1,14	0,87 - 1,50		2,36	1,67 - 3,48		1,60	1,14 - 2,13	
<1 oder > 9 Jahre (n=30, 34,1%)	3,18	2,52 - 5,59	<b>&lt; 0,001</b>	2,84	1,90 - 4,74	<b>0,005</b>	1,49	1,03 - 1,95	<b>0,024</b>	3,90	2,94 - 8,35	<b>&lt; 0,001</b>	1,59	1,26 - 2,77	<b>0,271</b>
Ansprechen auf Prednison															
gut (n=74, 84,1%)	2,50	1,87 - 3,25	<b>0,002</b>	2,19	1,55 - 3,00	<b>&lt; 0,001</b>	1,20	0,92 - 1,69	<b>0,646</b>	2,68	1,83 - 3,99	<b>0,093</b>	1,62	1,14 - 2,46	<b>0,389</b>
schlecht (n=11, 12,5%)	4,50	3,16 - 6,10		4,14	2,96 - 5,15		1,32	0,96 - 1,76		4,03	2,23 - 9,02		1,32	1,19 - 1,92	
Immunophänotyp															
B-Zell (n=64, 74,4%)	2,49	1,88 - 3,11	<b>0,012</b>	2,19	1,59 - 2,85	<b>&lt; 0,001</b>	1,25	0,99 - 1,66	<b>0,452</b>	2,68	1,87 - 3,63	<b>0,079</b>	1,78	1,34 - 2,54	<b>0,003</b>
T-Zell (n=22, 25,6%)	3,94	2,24 - 6,29		3,68	1,92 - 5,53		1,15	0,76 - 1,75		4,06	1,82 - 6,80		1,22	0,75 - 1,56	
Initiale Leukozyten															
< 50.000/µl (n=59, 67%)	2,33	1,84 - 3,09	<b>0,005</b>	1,98	1,40 - 2,77	<b>&lt; 0,001</b>	1,10	0,87 - 1,53	<b>0,025</b>	2,48	1,86 - 3,55	<b>0,009</b>	1,75	1,24 - 2,38	<b>0,349</b>
> 50.000/µl (n=29, 33%)	3,11	2,31 - 4,64		3,20	2,49 - 4,30		1,37	1,14 - 1,83		3,71	2,20 - 5,89		1,39	1,09 - 2,13	
Klinisches Ergebnis															
kein Rezidiv, Tod oder Knochenmarktransplantation (n=62, 70,5%)	2,43	1,84 - 3,25	<b>0,072</b>	2,28	1,60 - 3,00	<b>0,170</b>	1,17	0,92 - 1,70	<b>0,817</b>	2,54	1,81 - 3,78		1,69	1,17 - 2,27	<b>0,747</b>
Rezidiv, Tod oder Knochenmarktransplantation (n=26, 29,5%)	2,87	2,30 - 4,84		2,84	1,58 - 4,38		1,29	0,94 - 1,61		3,39	2,22 - 5,11		1,45	1,12 - 2,49	
TEL/AML 1															
negativ (n=43, 48,9%)	2,89	1,95 - 4,50	<b>0,208</b>	2,59	1,90 - 3,73	<b>0,067</b>	1,34	1,06 - 1,76	<b>0,611</b>	3,01	2,03 - 5,72	<b>0,445</b>	1,40	1,01 - 2,17	<b>0,029</b>
positiv (n=11, 12,5%)	2,14	1,21 - 3,86		1,86	1,40 - 2,36		1,18	0,84 - 1,78		2,98	2,19 - 3,45		2,56	1,62 - 2,81	
Plloidie															
≤ 50 Chromosomen (n=43, 48,9%)	3,05	2,30 - 4,60	<b>0,156</b>	2,83	2,15 - 3,65	<b>0,111</b>	1,45	1,06 - 1,89	<b>0,097</b>	3,13	1,97 - 4,91	<b>0,072</b>	1,76	1,28 - 2,46	<b>0,515</b>
> 50 Chromosomen (n=16, 18,2%)	2,33	1,89 - 4,11		1,98	1,38 - 3,04		1,09	0,87 - 1,53		2,06	1,18 - 3,25		1,44	1,20 - 2,44	

	KDM 4C			KDM 5A			KDM 5B			KDM 6A			KDM 6B		
	Median	Q1-Q3*	P-Wert	Median	Q1-Q3*	P-Wert	Median	Q1-Q3*	P-Wert	Median	Q1-Q3*	P-Wert	Median	Q1-Q3*	P-Wert
Alter															
1-9 Jahre (n=58, 65,9%)	1,96	1,28 - 2,64		1,12	0,83 - 1,54		1,69	1,19 - 2,56		1,39	0,99 - 2,08		0,22	0,13 - 0,32	
<1 oder > 9 Jahre (n=30, 34,1%)	2,28	1,16 - 3,55	<b>0,311</b>	1,72	1,05 - 2,30	<b>0,008</b>	4,17	2,25 - 5,31	<b>&lt; 0,001</b>	1,81	1,19 - 3,08	<b>0,134</b>	0,33	0,25 - 0,50	<b>0,002</b>
Ansprechen auf Prednison															
gut (n=74, 84,1%)	2,11	1,24 - 2,87	<b>0,514</b>	1,17	0,83 - 1,73	<b>0,135</b>	1,93	1,28 - 3,80	<b>0,006</b>	1,54	0,98 - 2,21	<b>0,112</b>	0,24	0,15 - 0,37	<b>0,004</b>
schlecht (n=11, 12,5%)	1,57	1,09 - 3,36		1,27	0,99 - 2,91		4,77	2,16 - 4,98		2,09	1,29 - 4,39		0,40	0,30 - 0,59	
Immunophänotyp															
B-Zell (n=64, 74,4%)	2,21	1,63 - 2,89	<b>0,050</b>	1,19	0,90 - 1,72	<b>0,592</b>	1,87	1,29 - 3,67	<b>0,035</b>	1,74	1,15 - 2,33	<b>0,539</b>	0,24	0,15 - 0,32	<b>0,006</b>
T-Zell (n=22, 25,6%)	1,31	1,01 - 3,06		1,22	0,86 - 2,38		4,16	1,95 - 4,78		1,44	0,95 - 2,24		0,38	0,22 - 0,53	
Initiale Leukozyten															
< 50.000/µl (n=59, 67%)	1,94	1,20 - 2,50	<b>0,022</b>	1,13	0,75 - 1,56	<b>0,006</b>	1,85	1,21 - 3,32	<b>0,002</b>	1,43	0,99 - 2,07	<b>0,099</b>	0,24	0,14 - 0,33	<b>0,028</b>
> 50.000/µl (n=29, 33%)	2,42	1,32 - 3,95		1,56	1,01 - 2,15		3,75	1,84 - 5,44		1,86	1,15 - 3,08		0,33	0,17 - 0,46	
Klinisches Ergebnis															
kein Rezidiv, Tod oder Knochenmarktransplantation (n=62, 70,5%)	2,13	1,23 - 2,86	<b>0,762</b>	1,15	0,86 - 1,72	<b>0,375</b>	1,85	1,22 - 3,75	<b>0,015</b>	1,59	1,00 - 2,14	<b>0,442</b>	0,23	0,14 - 0,32	<b>0,026</b>
Rezidiv, Tod oder Knochenmarktransplantation (n=26, 29,5%)	1,92	1,21 - 3,18		1,33	0,90 - 1,85		3,36	1,88 - 4,85		1,58	1,09 - 2,85		0,37	0,18 - 0,45	
TEL/AML 1															
negativ (n=43, 48,9%)	2,19	1,29 - 2,99	<b>0,497</b>	1,22	0,99 - 1,96	<b>0,553</b>	2,03	1,44 - 4,81	<b>0,832</b>	1,89	1,30 - 3,01	<b>0,118</b>	0,26	0,15 - 0,41	<b>0,703</b>
positiv (n=11, 12,5%)	2,27	1,74 - 3,45		1,20	0,75 - 1,96		2,27	1,74 - 4,27		1,21	0,84 - 2,07		0,27	0,15 - 0,45	
Plloidie															
≤ 50 Chromosomen (n=43, 48,9%)	2,23	1,20 - 3,05	<b>0,537</b>	1,27	0,92 - 1,88	<b>0,246</b>	2,20	1,35 - 4,27	<b>0,314</b>	1,81	1,16 - 2,47	<b>0,794</b>	0,26	0,16 - 0,43	<b>0,016</b>
> 50 Chromosomen (n=16, 18,2%)	1,81	1,23 - 2,83		1,12	0,71 - 1,49		1,73	1,23 - 3,17		1,74	1,33 - 2,84		0,14	0,11 - 0,30	

\*Q1 - unteres Quartil, Q3 - oberes Quartil, P-Wert mit Mann-Whitney-Test kalkuliert und Holm-Bonferroni korrigiert, grau unterlegt - statistisch signifikant nach Holm-Bonferroni-Korrektur



## 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Relative KDM-Isoenzym-Expression bei ALL-Patienten und gesunden Knochenmarkspendern .....	38
Abb. 2: Relative Expression von KDM6B bei ALL-Patienten, Zelllinie Jurkat und Zelllinie CCRF-CEM .....	41
Abb. 3: Zelltod in CCRF-CEM-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit A) Dexamethason, B) dem KDM6B-Inhibitor GSK-J4, C) Kombinationsbehandlung von GSK-J4 und Dexamethason.....	42
Abb. 4: Verlust des $\Delta\psi_m$ in CCRF-CEM-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit A) Dexamethason, B) dem KDM6B-Inhibitor GSK-J4, C) Kombinationsbehandlung von GSK-J4 und Dexamethason.....	42
Abb. 5: Zelltod in CCRF-CEM-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit A) Vincristin, B) dem KDM6B-Inhibitor GSK-J4, C) Kombinationsbehandlung von GSK-J4 und Vincristin .....	43
Abb. 6: Verlust des $\Delta\psi_m$ in CCRF-CEM-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit A) Vincristin, B) dem KDM6B-Inhibitor GSK-J4, C) Kombinationsbehandlung von GSK-J4 und Vincristin .....	44
Abb. 7: Zelltod in Jurkat-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit A) Dexamethason, B) dem KDM6B-Inhibitor GSK-J4, C) Kombinationsbehandlung von GSK-J4 und Dexamethason.....	45
Abb. 8: Verlust des $\Delta\psi_m$ in Jurkat-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit A) Dexamethason, B) dem KDM6B-Inhibitor GSK-J4, C) Kombinationsbehandlung von GSK-J4 und Dexamethason.....	45
Abb. 9: Zelltod in Jurkat-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit A) Vincristin, B) dem KDM6B-Inhibitor GSK-J4, C) Kombinationsbehandlung von GSK-J4 und Vincristin .....	46
Abb. 10: Verlust von $\Delta\psi_m$ in Jurkat-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit A) Vincristin, B) dem KDM6B-Inhibitor GSK-J4, C) Kombinationsbehandlung von GSK-J4 und Vincristin .....	47
Abb. 11: Verlust des Zelltods bei CCRF-CEM- und Jurkat-Zellen je mit GSK-J4-Monobehandlung (grau) und z-VAD-fmk-Vorbehandlung + GSK-J4 (schwarz). Kontrolle wurde mit DMSO behandelt (weiß). *p<0,05; **p<0,01 .....	48

Abb. 12: Verlust des  $\Delta\psi_m$  bei CCRF-CEM- und Jurkat-Zellen je mit GSK-J4-Monobehandlung (grau) und z-VAD-fmk-Vorbehandlung + GSK-J4 (schwarz) Kontrolle wurde mit DMSO behandelt (weiß). \*\*p<0,01 .... 48

### 8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Synonyme der zehn ausgewählten KDMs.....	12
Tabelle 2:	Chou-Talalay-Kombinationsindex (CI-Wert) für Kombinationsbehandlung von GSK J4 mit Dexamethason bei CCRF-CEM-Zellen. Bedeutung des Kombinationsindex: $CI > 1$ Antagonismus, $CI < 1$ Synergismus, $CI = 1$ rein additiver Effekt.....	44
Tabelle 3:	Chou-Talalay-Kombinationsindex (CI-Wert) für Kombinationsbehandlung von GSK J4 mit Vincristin bei CCRF-CEM-Zellen. Bedeutung des Kombinationsindex: $CI > 1$ Antagonismus, $CI < 1$ Synergismus, $CI = 1$ rein additiver Effekt.....	45
Tabelle 4:	Chou-Talalay-Kombinationsindex (CI-Wert) für Kombinationsbehandlung von GSK J4 mit Dexamethason bei Jurkat-Zellen. Bedeutung des Kombinationsindex: $CI > 1$ Antagonismus, $CI < 1$ Synergismus, $CI = 1$ rein additiver Effekt.....	47
Tabelle 5:	Chou-Talalay-Kombinationsindex (CI-Wert) für Kombinationsbehandlung von GSK J4 mit Vincristin bei Jurkat-Zellen. Bedeutung des Kombinationsindex: $CI > 1$ Antagonismus, $CI < 1$ Synergismus, $CI = 1$ rein additiver Effekt.....	48
Tabelle 6:	KDM-Expression in Korrelation mit ausgewählten klinisch-pathologischen Parametern .....	65

## 8.4 Literaturverzeichnis

- Agger K, Miyagi S, Pedersen MT, Kooistra SM, Johansen JV, Helin K. 2016. Jmjd2/Kdm4 demethylases are required for expression of Il3ra and survival of acute myeloid leukemia cells. *Genes Dev*, 30 (11):1278-1288.
- Agger K, Cloos PA, Rudkjaer L, Williams K, Andersen G, Christensen J, Helin K. 2009. The H3K27me3 demethylase JMJD3 contributes to the activation of the INK4A-ARF locus in response to oncogene- and stress-induced senescence. *Genes Dev*, 23 (10):1171-1176.
- Amente S, Lania L, Majello B. 2013. The histone LSD1 demethylase in stemness and cancer transcription programs. *Biochim Biophys Acta*, 1829 (10):981-986.
- Arico M, Schrappe M, Hunger SP, Carroll WL, Conter V, Galimberti S, Manabe A, Saha V, Baruchel A, Vettenranta K, Horibe K, Benoit Y, Pieters R, Escherich G, Silverman LB, Pui CH, Valsecchi MG. 2010. Clinical outcome of children with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated between 1995 and 2005. *J Clin Oncol*, 28 (31):4755-4761.
- Arrowsmith CH, Bountra C, Fish PV, Lee K, Schapira M. 2012. Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 11 (5):384-400.
- Backe MB, Andersson JL, Bacos K, Christensen DP, Hansen JB, Dorosz JJ, Gajhede M, Dahlby T, Bysani M, Kristensen LH, Ling C, Olsen L, Mandrup-Poulsen T. 2017. Lysine demethylase inhibition protects pancreatic beta cells from apoptosis and improves beta-cell function. *Mol Cell Endocrinol*.
- Barrett A, Madsen B, Copier J, Lu PJ, Cooper L, Scibetta AG, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J. 2002. PLU-1 nuclear protein, which is upregulated in breast cancer, shows restricted expression in normal human adult tissues: a new cancer/testis antigen? *Int J Cancer*, 101 (6):581-588.
- Bavetsias V, Langan RM, Ruda GF, Atrash B, McLaughlin MG, Tumber A, Mok NY, Le Bihan YV, Dempster S, Boxall KJ, Jeganathan F, Hatch SB, Savitsky P, Velupillai S, Krojer T, England KS, Sejberg J, Thai C, Donovan A, Pal A, Scozzafava G, Bennett JM, Kawamura A, Johansson C, Szykowska A, Gileadi C, Burgess-Brown NA, von Delft F, Oppermann U, Walters Z, Shipley J, Raynaud FI, Westaway SM, Prinjha RK, Fedorov O, Burke R, Schofield CJ, Westwood IM, Bountra C, Muller S, van Montfort RL, Brennan PE, Blagg J. 2016. 8-Substituted Pyrido[3,4-d]pyrimidin-4(3H)-one Derivatives As Potent, Cell Permeable, KDM4 (JMJD2) and KDM5 (JARID1) Histone Lysine Demethylase Inhibitors. *J Med Chem*, 59 (4):1388-1409.
- Beesley AH, Weller RE, Senanayake S, Welch M, Kees UR. 2009. Receptor mutation is not a common mechanism of naturally occurring glucocorticoid resistance in leukaemia cell lines. *Leuk Res*, 33 (2):321-325.
- Beesley AH, Palmer ML, Ford J, Weller RE, Cummings AJ, Freitas JR, Firth MJ, Perera KU, de Klerk NH, Kees UR. 2006. Authenticity and drug resistance in a panel of acute lymphoblastic leukaemia cell lines. *Br J Cancer*, 95 (11):1537-1544.

- Bhadri VA, Trahair TN, Lock RB. 2012. Glucocorticoid resistance in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *J Paediatr Child Health*, 48 (8):634-640.
- Burchfield JS, Li Q, Wang HY, Wang RF. 2015. JMJD3 as an epigenetic regulator in development and disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 67:148-157.
- Burgold T, Spreafico F, De Santa F, Totaro MG, Prosperini E, Natoli G, Testa G. 2008. The histone H3 lysine 27-specific demethylase Jmjd3 is required for neural commitment. *PLoS One*, 3 (8):e3034.
- Catchpole S, Spencer-Dene B, Hall D, Santangelo S, Rosewell I, Guenatri M, Beatson R, Scibetta AG, Burchell JM, Taylor-Papadimitriou J. 2011. PLU-1/JARID1B/KDM5B is required for embryonic survival and contributes to cell proliferation in the mammary gland and in ER+ breast cancer cells. *Int J Oncol*, 38 (5):1267-1277.
- Chang B, Chen Y, Zhao Y, Bruick RK. 2007. JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science*, 318 (5849):444-447.
- Chen Y, Yang Y, Wang F, Wan K, Yamane K, Zhang Y, Lei M. 2006. Crystal structure of human histone lysine-specific demethylase 1 (LSD1). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (38):13956-13961.
- Chou TC. 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev*, 58 (3):621-681.
- Ciccone DN, Su H, Hevi S, Gay F, Lei H, Bajko J, Xu G, Li E, Chen T. 2009. KDM1B is a histone H3K4 demethylase required to establish maternal genomic imprints. *Nature*, 461 (7262):415-418.
- Cloos PA, Christensen J, Agger K, Helin K. 2008. Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *Genes Dev*, 22 (9):1115-1140.
- Cloos PA, Christensen J, Agger K, Maiolica A, Rappsilber J, Antal T, Hansen KH, Helin K. 2006. The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3. *Nature*, 442 (7100):307-311.
- Cooper SL, Brown PA. 2015. Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am*, 62 (1):61-73.
- Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Raimondi SC, Sandlund JT, Rivera GK, Rubnitz JE, Ribeiro RC, Pui CH, Campana D. 2000. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 96 (8):2691-2696.
- Cregan S, Breslin M, Roche G, Wennstedt S, MacDonagh L, Albadri C, Gao Y, O'Byrne KJ, Cuffe S, Finn SP, Gray SG. 2017. Kdm6a and Kdm6b: Altered expression in malignant pleural mesothelioma. *Int J Oncol*, 50 (3):1044-1052.
- Das PP, Shao Z, Beyaz S, Apostolou E, Pinello L, De Los Angeles A, O'Brien K, Atsma JM, Fujiwara Y, Nguyen M, Ljuboja D, Guo G, Woo A, Yuan GC, Onder T, Daley G, Hochedlinger K, Kim J, Orkin SH. 2014. Distinct and combinatorial functions of Jmjd2b/Kdm4b and Jmjd2c/Kdm4c in mouse embryonic stem cell identity. *Mol Cell*, 53 (1):32-48.
- de Rooij JD, Hollink IH, Arentsen-Peters ST, van Galen JF, Berna Beverloo H, Baruchel A, Trka J, Reinhardt D, Sonneveld E, Zimmermann M, Alonzo TA, Pieters R, Meshinchi S, van den Heuvel-Eibrink MM, Zwaan CM. 2013. NUP98/JARID1A is a novel recurrent abnormality in pediatric acute megakaryoblastic leukemia with a distinct HOX gene expression pattern. *Leukemia*, 27 (12):2280-2288.

- De Santa F, Totaro MG, Prosperini E, Notarbartolo S, Testa G, Natoli G. 2007. The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. *Cell*, 130 (6):1083-1094.
- Dik WA, Pike-Overzet K, Weerkamp F, de Ridder D, de Haas EF, Baert MR, van der Spek P, Koster EE, Reinders MJ, van Dongen JJ, Langerak AW, Staal FJ. 2005. New insights on human T cell development by quantitative T cell receptor gene rearrangement studies and gene expression profiling. *J Exp Med*, 201 (11):1715-1723.
- DSMZa L-I 15.08.2017. Catalogue: ACC-282 (Jurkat) DSMZ Scientific Data [https://www.dsmz.de/de/kataloge/catalogue/culture/ACC-282.html?tx\\_dsmzresources\\_pi5%5BreturnPid%5D=192](https://www.dsmz.de/de/kataloge/catalogue/culture/ACC-282.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=192).
- DSMZb L-I 15.08.2017. Catalogue: ACC-240 (CCRF-CEM) DSMZ Scientific Data [https://www.dsmz.de/de/kataloge/catalogue/culture/ACC-240.html?tx\\_dsmzresources\\_pi5%5BreturnPid%5D=192](https://www.dsmz.de/de/kataloge/catalogue/culture/ACC-240.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=192).
- Ehrbrecht A, Muller U, Wolter M, Hoischen A, Koch A, Radlwimmer B, Actor B, Mincheva A, Pietsch T, Lichter P, Reifenberger G, Weber RG. 2006. Comprehensive genomic analysis of desmoplastic medulloblastomas: identification of novel amplified genes and separate evaluation of the different histological components. *J Pathol*, 208 (4):554-563.
- Florea C, Schneckeburger M, Grandjeanette C, Dicato M, Diederich M. 2011. Epigenomics of leukemia: from mechanisms to therapeutic applications. *Epigenomics*, 3 (5):581-609.
- Foley GE, Lazarus H, Farber S, Uzman BG, Boone BA, McCarthy RE. 1965. Continuous Culture of Human Lymphoblasts from Peripheral Blood of a Child with Acute Leukemia. *Cancer*, 18:522-529.
- Fonseca MB, Nunes AF, Morgado AL, Sola S, Rodrigues CM. 2012. Tap63gamma demethylation regulates protein stability and cellular distribution during neural stem cell differentiation. *PLoS One*, 7 (12):e52417.
- Fukuda T, Tokunaga A, Sakamoto R, Yoshida N. 2011. Fbxl10/Kdm2b deficiency accelerates neural progenitor cell death and leads to exencephaly. *Mol Cell Neurosci*, 46 (3):614-624.
- Gallagher KA, Joshi A, Carson WF, Schaller M, Allen R, Mukerjee S, Kittan N, Feldman EL, Henke PK, Hogaboam C, Burant CF, Kunkel SL. 2015. Epigenetic changes in bone marrow progenitor cells influence the inflammatory phenotype and alter wound healing in type 2 diabetes. *Diabetes*, 64 (4):1420-1430.
- Gaynon PS, Lustig RH. 1995. The use of glucocorticoids in acute lymphoblastic leukemia of childhood. Molecular, cellular, and clinical considerations. *J Pediatr Hematol Oncol*, 17 (1):1-12.
- Gaynon PS, Angiolillo AL, Carroll WL, Nachman JB, Trigg ME, Sather HN, Hunger SP, Devidas M, Children's Oncology G. 2010. Long-term results of the children's cancer group studies for childhood acute lymphoblastic leukemia 1983-2002: a Children's Oncology Group Report. *Leukemia*, 24 (2):285-297.
- Gidding CE, Kellie SJ, Kamps WA, de Graaf SS. 1999. Vincristine revisited. *Crit Rev Oncol Hematol*, 29 (3):267-287.
- Gruhn B, Naumann T, Gruner D, Walther M, Wittig S, Becker S, Beck JF, Sonnemann J. 2013. The expression of histone deacetylase 4 is

- associated with prednisone poor-response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*, 37 (10):1200-1207.
- Haras D, Amoros JP. 1994. [Polymerase chain reaction, cold probes and clinical diagnosis]. *Sante*, 4 (1):43-52.
- Harris WJ, Huang X, Lynch JT, Spencer GJ, Hitchin JR, Li Y, Ciceri F, Blaser JG, Greystoke BF, Jordan AM, Miller CJ, Ogilvie DJ, Somerville TC. 2012. The histone demethylase KDM1A sustains the oncogenic potential of MLL-AF9 leukemia stem cells. *Cancer Cell*, 21 (4):473-487.
- Hashizume R, Andor N, Ihara Y, Lerner R, Gan H, Chen X, Fang D, Huang X, Tom MW, Ngo V, Solomon D, Mueller S, Paris PL, Zhang Z, Petritsch C, Gupta N, Waldman TA, James CD. 2014. Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. *Nat Med*, 20 (12):1394-1396.
- Hayami S, Kelly JD, Cho HS, Yoshimatsu M, Unoki M, Tsunoda T, Field HI, Neal DE, Yamaue H, Ponder BA, Nakamura Y, Hamamoto R. 2011. Overexpression of LSD1 contributes to human carcinogenesis through chromatin regulation in various cancers. *Int J Cancer*, 128 (3):574-586.
- Hayami S, Yoshimatsu M, Veerakumarasivam A, Unoki M, Iwai Y, Tsunoda T, Field HI, Kelly JD, Neal DE, Yamaue H, Ponder BA, Nakamura Y, Hamamoto R. 2010. Overexpression of the JmJc histone demethylase KDM5B in human carcinogenesis: involvement in the proliferation of cancer cells through the E2F/RB pathway. *Mol Cancer*, 9:59.
- He J, Nguyen AT, Zhang Y. 2011. KDM2b/JHDM1b, an H3K36me2-specific demethylase, is required for initiation and maintenance of acute myeloid leukemia. *Blood*, 117 (14):3869-3880.
- He XB, Kim M, Kim SY, Yi SH, Rhee YH, Kim T, Lee EH, Park CH, Dixit S, Harrison FE, Lee SH. 2015. Vitamin C facilitates dopamine neuron differentiation in fetal midbrain through TET1- and JMJD3-dependent epigenetic control manner. *Stem Cells*, 33 (4):1320-1332.
- Heinemann B, Nielsen JM, Hudlebusch HR, Lees MJ, Larsen DV, Boesen T, Labelle M, Gerlach LO, Birk P, Helin K. 2014. Inhibition of demethylases by GSK-J1/J4. *Nature*, 514 (7520):E1-2.
- Hochberg J, Khaled S, Forman SJ, Cairo MS. 2013. Criteria for and outcomes of allogeneic haematopoietic stem cell transplant in children, adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukaemia in first complete remission. *Br J Haematol*, 161 (1):27-42.
- Hofstetter C, Kampka JM, Huppertz S, Weber H, Schlosser A, Muller AM, Becker M. 2016. Inhibition of KDM6 activity during murine ESC differentiation induces DNA damage. *J Cell Sci*, 129 (4):788-803.
- Hojfeldt JW, Agger K, Helin K. 2013. Histone lysine demethylases as targets for anticancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 12 (12):917-930.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (16):7276-7280.
- Holm S. 1979. A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, 6 (2):65-70.
- Hong Z, Li H, Li L, Wang W, Xu T. 2017. Different expression patterns of histone H3K27 demethylases in renal cell carcinoma and bladder cancer. *Cancer Biomark*, 18 (2):125-131.

- Hu Z, Gomes I, Horrigan SK, Kravarusic J, Mar B, Arbieva Z, Chyna B, Fulton N, Edassery S, Raza A, Westbrook CA. 2001. A novel nuclear protein, 5qNCA (LOC51780) is a candidate for the myeloid leukemia tumor suppressor gene on chromosome 5 band q31. *Oncogene*, 20 (47):6946-6954.
- Hunger SP, Mullighan CG. 2015. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med*, 373 (16):1541-1552.
- Jankowska AM, Makishima H, Tiu RV, Szpurka H, Huang Y, Traina F, Visconte V, Sugimoto Y, Prince C, O'Keefe C, Hsi ED, List A, Sekeres MA, Rao A, McDevitt MA, Maciejewski JP. 2011. Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A. *Blood*, 118 (14):3932-3941.
- Jaroszeski MJ, Radcliff G. 1999. Fundamentals of flow cytometry. *Mol Biotechnol*, 11 (1):37-53.
- Kaatsch P. 2010. Epidemiology of childhood cancer. *Cancer Treat Rev*, 36 (4):277-285.
- Kahl P, Gullotti L, Heukamp LC, Wolf S, Friedrichs N, Vorreuther R, Solleder G, Bastian PJ, Ellinger J, Metzger E, Schule R, Buettner R. 2006. Androgen receptor coactivators lysine-specific histone demethylase 1 and four and a half LIM domain protein 2 predict risk of prostate cancer recurrence. *Cancer Res*, 66 (23):11341-11347.
- Kauffman EC, Robinson BD, Downes MJ, Powell LG, Lee MM, Scherr DS, Gudas LJ, Mongan NP. 2011. Role of androgen receptor and associated lysine-demethylase coregulators, LSD1 and JMJD2A, in localized and advanced human bladder cancer. *Mol Carcinog*, 50 (12):931-944.
- Klose RJ, Yan Q, Tothova Z, Yamane K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Gilliland DG, Zhang Y, Kaelin WG, Jr. 2007. The retinoblastoma binding protein RBP2 is an H3K4 demethylase. *Cell*, 128 (5):889-900.
- Kooistra SM, Helin K. 2012. Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13 (5):297-311.
- Krishnan S, Trievel RC. 2013. Structural and functional analysis of JMJD2D reveals molecular basis for site-specific demethylation among JMJD2 demethylases. *Structure*, 21 (1):98-108.
- Kruidenier L, Chung CW, Cheng Z, Liddle J, Che K, Joberty G, Bantscheff M, Bountra C, Bridges A, Diallo H, Eberhard D, Hutchinson S, Jones E, Katso R, Leveridge M, Mander PK, Mosley J, Ramirez-Molina C, Rowland P, Schofield CJ, Sheppard RJ, Smith JE, Swales C, Tanner R, Thomas P, Tumber A, Drewes G, Oppermann U, Patel DJ, Lee K, Wilson DM. 2012. A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. *Nature*, 488 (7411):404-408.
- Kruskal WH, Wallis WA. 1952. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47 (260):583-621.
- Lee MG, Wynder C, Schmidt DM, McCafferty DG, Shiekhatar R. 2006. Histone H3 lysine 4 demethylation is a target of nonselective antidepressive medications. *Chem Biol*, 13 (6):563-567.



- Lee S, Lee JW, Lee SK. 2012. UTX, a histone H3-lysine 27 demethylase, acts as a critical switch to activate the cardiac developmental program. *Dev Cell*, 22 (1):25-37.
- Li Q, Wang HY, Chepelev I, Zhu Q, Wei G, Zhao K, Wang RF. 2014. Stage-dependent and locus-specific role of histone demethylase Jumonji D3 (JMJD3) in the embryonic stages of lung development. *PLoS Genet*, 10 (7):e1004524.
- Li Y, Deng C, Hu X, Patel B, Fu X, Qiu Y, Brand M, Zhao K, Huang S. 2012. Dynamic interaction between TAL1 oncoprotein and LSD1 regulates TAL1 function in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene*, 31 (48):5007-5018.
- Liddle GW. 1961. Clinical pharmacology of the anti-inflammatory steroids. *Clin Pharmacol Ther*, 2:615-635.
- Liggins AP, Lim SH, Soilleux EJ, Pulford K, Banham AH. 2010. A panel of cancer-testis genes exhibiting broad-spectrum expression in haematological malignancies. *Cancer Immun*, 10:8.
- Lim S, Janzer A, Becker A, Zimmer A, Schule R, Buettner R, Kirfel J. 2010. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is highly expressed in ER-negative breast cancers and a biomarker predicting aggressive biology. *Carcinogenesis*, 31 (3):512-520.
- Linnet MS, Brown LM, Mbulaiteye SM, Check D, Ostroumova E, Landgren A, Devesa SS. 2016. International long-term trends and recent patterns in the incidence of leukemias and lymphomas among children and adolescents ages 0-19 years. *Int J Cancer*, 138 (8):1862-1874.
- Liu G, Bollig-Fischer A, Kreike B, van de Vijver MJ, Abrams J, Ethier SP, Yang ZQ. 2009. Genomic amplification and oncogenic properties of the GASC1 histone demethylase gene in breast cancer. *Oncogene*, 28 (50):4491-4500.
- Liu Z, Chen X, Zhou S, Liao L, Jiang R, Xu J. 2015. The histone H3K9 demethylase Kdm3b is required for somatic growth and female reproductive function. *Int J Biol Sci*, 11 (5):494-507.
- Loh YH, Zhang W, Chen X, George J, Ng HH. 2007. Jmjd1a and Jmjd2c histone H3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells. *Genes Dev*, 21 (20):2545-2557.
- Maes T, Carceller E, Salas J, Ortega A, Buesa C. 2015. Advances in the development of histone lysine demethylase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol*, 23:52-60.
- Maiques-Diaz A, Somervaille TC. 2016. LSD1: biologic roles and therapeutic targeting. *Epigenomics*, 8 (8):1103-1116.
- Mann HB, Whitney DR. 1947. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *Ann Math Statist*, 18 (1):50-60.
- Mathur R, Sehgal L, Havranek O, Kohrer S, Khashab T, Jain N, Burger JA, Neelapu SS, Davis RE, Samaniego F. 2017. Inhibition of demethylase KDM6B sensitizes diffuse large B-cell lymphoma to chemotherapeutic drugs. *Haematologica*, 102 (2):373-380.
- Medh RD, Webb MS, Miller AL, Johnson BH, Fofanov Y, Li T, Wood TG, Luxon BA, Thompson EB. 2003. Gene expression profile of human lymphoid CEM cells sensitive and resistant to glucocorticoid-evoked apoptosis. *Genomics*, 81 (6):543-555.

- Messer HG, Jacobs D, Dhummakupt A, Bloom DC. 2015. Inhibition of H3K27me3-specific histone demethylases JMJD3 and UTX blocks reactivation of herpes simplex virus 1 in trigeminal ganglion neurons. *J Virol*, 89 (6):3417-3420.
- Metzger E, Wissmann M, Yin N, Muller JM, Schneider R, Peters AH, Gunther T, Buettner R, Schule R. 2005. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature*, 437 (7057):436-439.
- Mohammad HP, Smitheman KN, Kamat CD, Soong D, Federowicz KE, Van Aller GS, Schneck JL, Carson JD, Liu Y, Butticello M, Bonnette WG, Gorman SA, Degenhardt Y, Bai Y, McCabe MT, Pappalardi MB, Kaspavec J, Tian X, McNulty KC, Rouse M, McDevitt P, Ho T, Crouthamel M, Hart TK, Concha NO, McHugh CF, Miller WH, Dhanak D, Tummino PJ, Carpenter CL, Johnson NW, Hann CL, Kruger RG. 2015. A DNA Hypomethylation Signature Predicts Antitumor Activity of LSD1 Inhibitors in SCLC. *Cancer Cell*, 28 (1):57-69.
- Moore A, Pinkerton R. 2009. Vincristine: Can its therapeutic index be enhanced? *Pediatr Blood Cancer*, 53 (7):1180-1187.
- Moorman AV, Harrison CJ, Buck GA, Richards SM, Secker-Walker LM, Martineau M, Vance GH, Cherry AM, Higgins RR, Fielding AK, Foroni L, Paietta E, Tallman MS, Litzow MR, Wiernik PH, Rowe JM, Goldstone AH, Dewald GW, Adult Leukaemia Working Party MRCNCRI. 2007. Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood*, 109 (8):3189-3197.
- Moricke A, Zimmermann M, Reiter A, Gadner H, Odenwald E, Harbott J, Ludwig WD, Riehm H, Schrappe M. 2005. Prognostic impact of age in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia: data from the trials ALL-BFM 86, 90, and 95. *Klin Padiatr*, 217 (6):310-320.
- Moricke A, Reiter A, Zimmermann M, Gadner H, Stanulla M, Dordelmann M, Loning L, Beier R, Ludwig WD, Ratei R, Harbott J, Boos J, Mann G, Niggli F, Feldges A, Henze G, Welte K, Beck JD, Klingebiel T, Niemeyer C, Zintl F, Bode U, Urban C, Wehinger H, Niethammer D, Riehm H, Schrappe M, German-Austrian-Swiss ALLBFMSG. 2008. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood*, 111 (9):4477-4489.
- Morozov VM, Li Y, Clowers MM, Ishov AM. 2017. Inhibitor of H3K27 demethylase JMJD3/UTX GSK-J4 is a potential therapeutic option for castration resistant prostate cancer. *Oncotarget*.
- Mould DP, McGonagle AE, Wiseman DH, Williams EL, Jordan AM. 2015. Reversible inhibitors of LSD1 as therapeutic agents in acute myeloid leukemia: clinical significance and progress to date. *Med Res Rev*, 35 (3):586-618.
- Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, Girtman K, Mathew S, Ma J, Pounds SB, Su X, Pui CH, Relling MV, Evans WE, Shurtleff SA, Downing JR. 2007. Genome-wide analysis of

- genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, 446 (7137):758-764.
- Nachman JB, Heerema NA, Sather H, Camitta B, Forestier E, Harrison CJ, Dastugue N, Schrappe M, Pui CH, Basso G, Silverman LB, Janka-Schaub GE. 2007. Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 110 (4):1112-1115.
- Norman MR, Thompson EB. 1977. Characterization of a glucocorticoid-sensitive human lymphoid cell line. *Cancer Res*, 37 (10):3785-3791.
- Ntziachristos P, Tsirigos A, Welstead GG, Trimarchi T, Bakogianni S, Xu L, Loizou E, Holmfeldt L, Strikoudis A, King B, Mullenders J, Becksfort J, Nedjic J, Paietta E, Tallman MS, Rowe JM, Tonon G, Satoh T, Kruidenier L, Prinjha R, Akira S, Van Vlierberghe P, Ferrando AA, Jaenisch R, Mullighan CG, Aifantis I. 2014. Contrasting roles of histone 3 lysine 27 demethylases in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, 514 (7523):513-517.
- Ohguchi H, Harada T, Sagawa M, Kikuchi S, Tai YT, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC. 2017. KDM6B modulates MAPK pathway mediating multiple myeloma cell growth and survival. *Leukemia*.
- Ohtani K, Zhao C, Dobrev G, Manavski Y, Kluge B, Braun T, Rieger MA, Zeiher AM, Dimmeler S. 2013. Jmjd3 controls mesodermal and cardiovascular differentiation of embryonic stem cells. *Circ Res*, 113 (7):856-862.
- Patani N, Jiang WG, Newbold RF, Mokbel K. 2011. Histone-modifier gene expression profiles are associated with pathological and clinical outcomes in human breast cancer. *Anticancer Res*, 31 (12):4115-4125.
- Pointon JJ, Harvey D, Karaderi T, Appleton LH, Farrar C, Wordsworth BP. 2011. The histone demethylase JARID1A is associated with susceptibility to ankylosing spondylitis. *Genes Immun*, 12 (5):395-398.
- Prince HM, Bishton MJ, Harrison SJ. 2009. Clinical studies of histone deacetylase inhibitors. *Clin Cancer Res*, 15 (12):3958-3969.
- Pui C-H, Robison LL, Look AT. 2008. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, 371 (9617):1030-1043.
- Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. 2011. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol*, 29 (5):551-565.
- Pui CH, Campana D, Pei D, Bowman WP, Sandlund JT, Kaste SC, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Raimondi SC, Onciu M, Coustan-Smith E, Kun LE, Jeha S, Cheng C, Howard SC, Simmons V, Bayles A, Metzger ML, Boyett JM, Leung W, Handgretinger R, Downing JR, Evans WE, Relling MV. 2009. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med*, 360 (26):2730-2741.
- Riehm H, Reiter A, Schrappe M, Berthold F, Dopfer R, Gerein V, Ludwig R, Ritter J, Stollmann B, Henze G. 1987. [Corticosteroid-dependent reduction of leukocyte count in blood as a prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia in childhood (therapy study ALL-BFM 83)]. *Klin Padiatr*, 199 (3):151-160.
- Roesch A, Fukunaga-Kalabis M, Schmidt EC, Zabierowski SE, Brafford PA, Vultur A, Basu D, Gimotty P, Vogt T, Herlyn M. 2010. A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell*, 141 (4):583-594.

- Rudolph T, Beuch S, Reuter G. 2013. Lysine-specific histone demethylase LSD1 and the dynamic control of chromatin. *Biol Chem*, 394 (8):1019-1028.
- Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G. 1977. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer*, 19 (5):621-626.
- Schulte JH, Lim S, Schramm A, Friedrichs N, Koster J, Versteeg R, Ora I, Pajtler K, Klein-Hitpass L, Kuhfittig-Kulle S, Metzger E, Schule R, Eggert A, Buettner R, Kirfel J. 2009. Lysine-specific demethylase 1 is strongly expressed in poorly differentiated neuroblastoma: implications for therapy. *Cancer Res*, 69 (5):2065-2071.
- Schuz J, Erdmann F. 2016. Environmental Exposure and Risk of Childhood Leukemia: An Overview. *Arch Med Res*, 47 (8):607-614.
- Sharma S, Kelly TK, Jones PA. 2010. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 31 (1):27-36.
- Shen Y, Guo X, Wang Y, Qiu W, Chang Y, Zhang A, Duan X. 2012. Expression and significance of histone H3K27 demethylases in renal cell carcinoma. *BMC Cancer*, 12:470.
- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y. 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, 119 (7):941-953.
- Shi Y, Sawada J, Sui G, Affar el B, Whetstine JR, Lan F, Ogawa H, Luke MP, Nakatani Y, Shi Y. 2003. Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex. *Nature*, 422 (6933):735-738.
- Smith M, Arthur D, Camitta B, Carroll AJ, Crist W, Gaynon P, Gelber R, Heerema N, Korn EL, Link M, Murphy S, Pui CH, Pullen J, Reamon G, Sallan SE, Sather H, Shuster J, Simon R, Trigg M, Tubergen D, Uckun F, Ungerleider R. 1996. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 14 (1):18-24.
- Starkova J, Zamostna B, Mejstrikova E, Krejci R, Drabkin HA, Trka J. 2010. HOX gene expression in phenotypic and genotypic subgroups and low HOXA gene expression as an adverse prognostic factor in pediatric ALL. *Pediatr Blood Cancer*, 55 (6):1072-1082.
- Su H, Ma X, Huang Y, Han H, Zou Y, Huang W. 2015. JARID1B deletion induced apoptosis in Jeko-1 and HL-60 cell lines. *Int J Clin Exp Pathol*, 8 (1):171-183.
- Tian X, Zhang S, Liu HM, Zhang YB, Blair CA, Mercola D, Sassone-Corsi P, Zi X. 2013. Histone lysine-specific methyltransferases and demethylases in carcinogenesis: new targets for cancer therapy and prevention. *Curr Cancer Drug Targets*, 13 (5):558-579.
- Tzatsos A, Paskaleva P, Ferrari F, Deshpande V, Stoykova S, Contino G, Wong KK, Lan F, Trojer P, Park PJ, Bardeesy N. 2013. KDM2B promotes pancreatic cancer via Polycomb-dependent and -independent transcriptional programs. *J Clin Invest*, 123 (2):727-739.
- Ueda T, Nagamachi A, Takubo K, Yamasaki N, Matsui H, Kanai A, Nakata Y, Ikeda K, Konuma T, Oda H, Wolff L, Honda Z, Wu X, Helin K, Iwama A, Suda T, Inaba T, Honda H. 2015. Fbxl10 overexpression in murine hematopoietic stem cells induces leukemia involving metabolic activation and upregulation of Nsg2. *Blood*, 125 (22):3437-3446.

- Valk PJ, Verhaak RG, Beijen MA, Erpelinck CA, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Boer JM, Beverloo HB, Moorhouse MJ, van der Spek PJ, Lowenberg B, Delwel R. 2004. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 350 (16):1617-1628.
- Van der Meulen J, Sanghvi V, Mavrakis K, Durinck K, Fang F, Matthijssens F, Rondou P, Rosen M, Pieters T, Vandenberghe P, Delabesse E, Lammens T, De Moerloose B, Menten B, Van Roy N, Verhasselt B, Poppe B, Benoit Y, Taghon T, Melnick AM, Speleman F, Wendel HG, Van Vlierberghe P. 2015. The H3K27me3 demethylase UTX is a gender-specific tumor suppressor in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 125 (1):13-21.
- van Haaften G, Dalgliesh GL, Davies H, Chen L, Bignell G, Greenman C, Edkins S, Hardy C, O'Meara S, Teague J, Butler A, Hinton J, Latimer C, Andrews J, Barthorpe S, Beare D, Buck G, Campbell PJ, Cole J, Forbes S, Jia M, Jones D, Kok CY, Leroy C, Lin ML, McBride DJ, Maddison M, Maquire S, McLay K, Menzies A, Mironenko T, Mulderrig L, Mudie L, Pleasance E, Shepherd R, Smith R, Stebbings L, Stephens P, Tang G, Tarpey PS, Turner R, Turrell K, Varian J, West S, Widaa S, Wray P, Collins VP, Ichimura K, Law S, Wong J, Yuen ST, Leung SY, Tonon G, DePinho RA, Tai YT, Anderson KC, Kahnoski RJ, Massie A, Khoo SK, Teh BT, Stratton MR, Futreal PA. 2009. Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. *Nat Genet*, 41 (5):521-523.
- van Schaik RH. 2008. CYP450 pharmacogenetics for personalizing cancer therapy. *Drug Resist Updat*, 11 (3):77-98.
- van Zutven LJ, Onen E, Velthuizen SC, van Drunen E, von Bergh AR, van den Heuvel-Eibrink MM, Veronese A, Mecucci C, Negrini M, de Greef GE, Beverloo HB. 2006. Identification of NUP98 abnormalities in acute leukemia: JARID1A (12p13) as a new partner gene. *Genes Chromosomes Cancer*, 45 (5):437-446.
- Vogt T, Kroiss M, McClelland M, Gruss C, Becker B, Bosserhoff AK, Rumpler G, Bogenrieder T, Landthaler M, Stolz W. 1999. Deficiency of a novel retinoblastoma binding protein 2-homolog is a consistent feature of sporadic human melanoma skin cancer. *Lab Invest*, 79 (12):1615-1627.
- Wada T, Koyama D, Kikuchi J, Honda H, Furukawa Y. 2015. Overexpression of the shortest isoform of histone demethylase LSD1 primes hematopoietic stem cells for malignant transformation. *Blood*, 125 (24):3731-3746.
- Wang GG, Song J, Wang Z, Dormann HL, Casadio F, Li H, Luo JL, Patel DJ, Allis CD. 2009a. Haematopoietic malignancies caused by dysregulation of a chromatin-binding PHD finger. *Nature*, 459 (7248):847-851.
- Wang H, Song C, Ding Y, Pan X, Ge Z, Tan BH, Gowda C, Sachdev M, Muthusami S, Ouyang H, Lai L, Francis OL, Morris CL, Abdel-Azim H, Dorsam G, Xiang M, Payne KJ, Dovat S. 2016. Transcriptional Regulation of JARID1B/KDM5B Histone Demethylase by Ikaros, Histone Deacetylase 1 (HDAC1), and Casein Kinase 2 (CK2) in B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Biol Chem*, 291 (8):4004-4018.
- Wang J, Hevi S, Kurash JK, Lei H, Gay F, Bajko J, Su H, Sun W, Chang H, Xu G, Gaudet F, Li E, Chen T. 2009b. The lysine demethylase LSD1

- (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat Genet*, 41 (1):125-129.
- Wang L, Chang J, Varghese D, Dellinger M, Kumar S, Best AM, Ruiz J, Bruick R, Pena-Llopis S, Xu J, Babinski DJ, Frantz DE, Brekken RA, Quinn AM, Simeonov A, Easmon J, Martinez ED. 2013. A small molecule modulates Jumonji histone demethylase activity and selectively inhibits cancer growth. *Nat Commun*, 4:2035.
- Wang Y, Zhang H, Chen Y, Sun Y, Yang F, Yu W, Liang J, Sun L, Yang X, Shi L, Li R, Li Y, Zhang Y, Li Q, Yi X, Shang Y. 2009c. LSD1 is a subunit of the NuRD complex and targets the metastasis programs in breast cancer. *Cell*, 138 (4):660-672.
- Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. 2014. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*, 64 (2):83-103.
- Weichert W. 2009. HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. *Cancer Lett*, 280 (2):168-176.
- Whetstine JR, Nottke A, Lan F, Huarte M, Smolikov S, Chen Z, Spooner E, Li E, Zhang G, Colaiacovo M, Shi Y. 2006. Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell*, 125 (3):467-481.
- Wigle TJ, Copeland RA. 2013. Drugging the human methylome: an emerging modality for reversible control of aberrant gene transcription. *Curr Opin Chem Biol*, 17 (3):369-378.
- Wu J, Hu L, Du Y, Kong F, Pan Y. 2015. Prognostic role of LSD1 in various cancers: evidence from a meta-analysis. *Onco Targets Ther*, 8:2565-2570.
- Xiang Y, Zhu Z, Han G, Lin H, Xu L, Chen CD. 2007a. JMJD3 is a histone H3K27 demethylase. *Cell Res*, 17 (10):850-857.
- Xiang Y, Zhu Z, Han G, Ye X, Xu B, Peng Z, Ma Y, Yu Y, Lin H, Chen AP, Chen CD. 2007b. JARID1B is a histone H3 lysine 4 demethylase up-regulated in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (49):19226-19231.
- Yamamoto K, Tateishi K, Kudo Y, Sato T, Yamamoto S, Miyabayashi K, Matsusaka K, Asaoka Y, Ijichi H, Hirata Y, Otsuka M, Nakai Y, Isayama H, Ikenoue T, Kurokawa M, Fukayama M, Kokudo N, Omata M, Koike K. 2014. Loss of histone demethylase KDM6B enhances aggressiveness of pancreatic cancer through downregulation of C/EBPalpha. *Carcinogenesis*, 35 (11):2404-2414.
- Yan Q, Sun L, Zhu Z, Wang L, Li S, Ye RD. 2014. Jmjd3-mediated epigenetic regulation of inflammatory cytokine gene expression in serum amyloid A-stimulated macrophages. *Cell Signal*, 26 (9):1783-1791.
- Yang ZQ, Imoto I, Fukuda Y, Pimkhaokham A, Shimada Y, Imamura M, Sugano S, Nakamura Y, Inazawa J. 2000. Identification of a novel gene, GASC1, within an amplicon at 9p23-24 frequently detected in esophageal cancer cell lines. *Cancer Res*, 60 (17):4735-4739.
- Yoshimi A, Kurokawa M. 2011. Key roles of histone methyltransferase and demethylase in leukemogenesis. *J Cell Biochem*, 112 (2):415-424.
- Zhang QJ, Chen HZ, Wang L, Liu DP, Hill JA, Liu ZP. 2011. The histone trimethyllysine demethylase JMJD2A promotes cardiac hypertrophy in response to hypertrophic stimuli in mice. *J Clin Invest*, 121 (6):2447-2456.

- Zhao ZK, Dong P, Gu J, Chen L, Zhuang M, Lu WJ, Wang DR, Liu YB. 2013. Overexpression of LSD1 in hepatocellular carcinoma: a latent target for the diagnosis and therapy of hepatoma. *Tumour Biol*, 34 (1):173-180.
- Zhou M, Zeng J, Wang X, Wang X, Huang T, Fu Y, Sun T, Jia J, Chen C. 2015. Histone demethylase RBP2 decreases miR-21 in blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Oncotarget*, 6 (2):1249-1261.

## 8.5 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. James Beck für die kontinuierliche Unterstützung und hilfreichen Ratschläge in den regelmäßigen Besprechungen während meiner Promotion bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Jürgen Sonnenmann für die tatkräftige Betreuung und Unterstützung während der ganzen Arbeit. Danke für die vielen konstruktiven und inspirierenden Denkanstöße, das geteilte Wissen, die ständige Motivation und deine grenzenlos optimistische Art!

Vielen Dank an Sabine Becker für die aktive Laborbetreuung, die praktischen Tipps und geteilten Erfahrungen während meiner Experimente. Durch deine organisierte Planung und Arbeitsweise konnte ich meine Experimente zügig und nahezu reibungslos durchführen.

Vielen Dank an Dr. Mario Walther für die gute Zusammenarbeit und Beratung bei der statistischen Auswertung.

Ich möchte mich beim IZKF für die Unterstützung durch das halbjährige Promotionsstipendium bedanken.

Mein Dank gilt meinen Freunden, die mit Humor und aufbauenden Worten während der gesamten Promotion hinter mir standen. Ein großer Dank geht besonders an meine Freundin Marie Kühne, die mir bedingungslos zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Danke für deine einfallsreichen Ratschläge, deine ermunternden Worte und deine gern geopfert Zeit.

Ich möchte mich von ganzem Herzen bei meiner großartigen Familie bedanken. Ihr habt mich in jeder nur denkbaren Weise unterstützt, habt mir selbstlos den Rücken freigehalten, damit ich promovieren kann. Wenn es euch an Fachwissen gefehlt hat, habt ihr die Ratschläge durch Liebe, Motivation und Freude ersetzt und mich immer wieder aufgebaut. Ich bin euch unendlich dankbar für diese Unterstützung und die vielen lieben Worte und Gesten, auch während meines Studium. Danke für alles!



## 8.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. James Beck, Dr. Jürgen Sonnemann, Dr. Mario Walther, Sabine Becker, Marie Kühne,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Dresden, den

Elisabeth Walter